



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Larissa Moreira Siqueira

Modulação de macrófagos murinos pelo Glucantime

Rio de Janeiro

2019

Larissa Moreira Siqueira

Modulação de macrófagos murinos pelo Glucantime

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Siqueira, Larissa Moreira.
Modulação de macrófagos murinos pelo Glucantime / Larissa Moreira Siqueira
– 2019.
83 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Leishmaniose - Teses. 2. Antimoniato de Meglumina. 3. Muridae. 4. LariMacrófagos Peritoneais 5. Modulação Antigênica. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Larissa Moreira Siqueira

Modulação de macrófagos murinos pelo Glucantime

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 16 de julho de 2019.

Orientadora: Prof. ^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva
Faculdade de Ciências Médicas- UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto
Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Valter Viana de Andrade Neto
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a mim mesma pelo meu esforço e minha persistência e às minhas avós, que sempre me incentivaram a estudar e acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, coragem e muita perseverança para seguir e concluir essa caminhada longa e árdua, mas que sempre almejei.

Agradeço aos meus pais, Elizabeth e Danilo, por todo apoio nas decisões que fiz e às minhas avós, Iza e Lourdes, por sempre acreditarem no meu potencial, por me apoiarem em todas as decisões, me incentivarem a estudar sempre mais e a nunca desistir. Aos meus irmãos, primos e tios, principalmente os de Minas Gerais, por acreditarem no meu potencial e me inspirar a sempre seguir o caminho dos estudos e por fazerem parte da minha vida.

Ao Françua pelo apoio e companheirismo nesse finalzinho de tese, que é uma época bem estressante, o meu obrigado pela paciência e ajuda.

Ao Bruno Amaral Franco, meu médico, que me ajudou muito nesse último ano, agradeço pelas conversas e pela ajuda.

À minha querida orientadora Dra. Silvia Amaral, por ter me aceitado como aluna lá no meu mestrado, mesmo sem me conhecer ela acreditou em mim e no meu potencial. Agradeço por ser comigo tão atenciosa, compreensiva, paciente e amiga, mesmo eu passando a fugir das suas reuniões e seminários, rs. Obrigada pelos seus conselhos, incentivos, apoio, pela sua presença em todos os momentos e aflições dessa tese ah, e também pelas broncas e puxões de orelha que serviram de lição e aprendizado, sem sua ajuda, apoio e suporte esse trabalho não seria possível de ser realizado.

A todos os membros do laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, alunos e a técnica Michely, pelo bom convívio, aprendizado, discussões científicas e companheirismo, em especial as meninas que além de colegas de trabalho passaram a ser minhas amigas fora do meio científico: Thayssa, Rafaella, Andréia, Bianca e Júlia.

Às minhas amigas de infância Alícia, Luiana e Raquel por sempre entenderem quando eu falava que não poderia ir ou chegar no horário por estar fazendo experimento ou em casa mesmo só que estudando, por me escutarem e já entenderem um pouco sobre leishmaniose, células do sistema fagocítico mononuclear, sempre me escutando com aquelas caras de entedimento, sqn, rrsrrsrs, com a mesma cara de paisagem que eu fico quando elas começam a falar sobre fechamento de folha, férias, imposto de renda e blá, blá, blá.

Ao Professor Alexandre Bello que ao longo do meu doutorado, principalmente nesse final, sempre se mostrou um amigo e me ajudou bastante, sempre se preocupando e me incentivando a continuar nesse caminho e terminar essa tese.

Obrigada a todos os professores, técnicos e alunos da disciplina de Parasitologia pelo bom convívio, pelas conversas na copa e também durante o trabalho e pela ajuda na minha formação científica. Em especial aos amigos que levo para fora da disciplina como a Shay, Bruno, Makoto, Aline e Ludmila.

Ao Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos e à Dra Marilene Marcuzzo do Canto Cavaleiro por terem me iniciado na vida científica, quando eu ainda estava lá no começo da faculdade e terem me incentivado a não desistir de seguir esse caminho longo da pesquisa. E ao Caio por aceitar esse trabalho árduo de revisar essa tese.

À minha amiga Viviane Faiões por me apoiar, incentivar e escutar minhas angústias científicas e não científicas também.

À Dra Luciana Rodrigues pela colaboração e disponibilidade de me receber em seu laboratório para o experimento de dosagem das citocinas, pelas análises dos resultados gerados pelo citômetro e pelo aceite na banca.

À Dra Patrícia Maria Lourenço Dutra, pela ajuda quando necessária, também pelos momentos de desconcentração e amizade e também por fazer parte da banca examinadora.

Ao Dr Eduardo Fonseca Pinto pelo aceite na banca examinadora.

Ao Dr. Valter Viana de Andrade Neto pela disponibilidade em ajudar sempre que eu precisei e pelo aceite na banca examinadora.

A todos que de alguma forma participaram desse momento e não citei aqui, meus sinceros agradecimentos. E não esquecendo de agradecer a CAPES e a Faperj pelo apoio financeiro.

Obrigada!!!

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama

RESUMO

SIQUEIRA, Larissa Moreira. *Modulação de macrófagos murinos pelo Glucantime*. 2019. 83f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

No Brasil e na maioria dos países endêmicos, os antimoniais pentavalentes, tais como o Glucantime, são usados como terapia de primeira escolha tratamento das leishmanioses. Embora seu mecanismo de ação não seja completamente esclarecido, sua ação antiparasitária se dá principalmente após redução do antimônio pentavalente (SbV) para trivalente (SbIII) sobre as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. O SbIII compromete o potencial redox levando danos a cadeia respiratória, e atua sobre a topoisomerase II danificando o DNA do parasito. Alguns estudos apontam para a ação dos antimoniais sobre a célula hospedeira, mostrando aumento na capacidade fagocítica e na produção de TNF por fagócitos. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade do Glucantime modular a funcionalidade de macrófagos residentes de peritônio murino. *In vitro* avaliamos o efeito do tratamento direto com Glucantime (0-10 mg/mL) por 24-48h em monocamadas de macrófagos murinos peritoneais. *In vivo*, tratamos camundongos swiss por 5 dias consecutivos com 8 mg de Glucantime pela via intraperitoneal (IP) ou pela via intramuscular (IM) e obtivemos os macrófagos peritoneais. Avaliamos nesses macrófagos a sua capacidade fagocítica (usando *beads* fluorescentes) e ação microbicida (amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*), produção de óxido nítrico (reagente de Griess) e perfil de citocinas (método CBA). Os resultados mostraram que nas concentrações até 20 mg/ml, o Glucantime não alterou a viabilidade dos macrófagos *in vitro*. A capacidade fagocítica e a produção de NO não foi alterada frente ao tratamento com o Glucantime. Quando previamente tratados com Glucantime, os macrófagos demonstraram capacidade microbicida aumentada para *T. cruzi*, mas sem correlação direta com produção de NO nas condições testadas. Os macrófagos tratados com Glucantime demonstraram produção aumentada de TNF e IL-6, mas após a infecção com *L. braziliensis*, os níveis de TNF e IL-6 diminuíram, bem como os níveis de IL-10 de maneira dose-dependente. Entretanto, a razão TNF/ IL-10 mostrou tendência ao perfil inflamatório dos macrófagos estando eles infectados ou não. Em macrófagos oriundos de animais tratados *in vivo* com Glucantime, tanto IP como IM, observamos tendência ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, sendo confirmado pela razão TNF/IL-10 ($p < 0,05$). Macrófagos oriundos de animais tratados pela via IM, apresentaram aumento na capacidade microbicida para amastigotas intracelulares tanto de *L. braziliensis* ($p < 0,05$) quanto de *T. cruzi* ($p < 0,05$), sem correlação com produção de NO nas condições testadas. Esses resultados sugerem que o Glucantime é capaz de modular os macrófagos para um estado pró-inflamatório que pode contribuir para o efeito antiparasitário do fármaco.

Palavras-chave: Glucantime. Antimonial pentavalente. Macrófagos peritoneais. Modulação.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Larissa Moreira. *Macrophage murine modulation of Glucantime*. 2019. 83f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

In Brazil and in most endemic countries, pentavalent antimonials, such as Glucantime, are used as first-line treatment for leishmaniasis. Although its mechanism of action is not fully understood, its antiparasitic action occurs mainly after reduction of pentavalent antimony (SbV) to trivalent (SbIII) on the intracellular amastigote forms of *Leishmania* spp. SbIII compromises the redox potential causing damage to the respiratory chain, and acts on topoisomerase II, damaging the DNA of the parasite. Some studies point to the action of antimonials on the host cell, showing an increase in phagocytic capacity and in the production of TNF by phagocytes. The aim of this study was to investigate the ability of Glucantime to modulate the functionality of murine peritoneum resident macrophages. *In vitro* we evaluated the effect of direct treatment with Glucantime (0-10 mg / mL) for 24-48h on monolayers of murine peritoneal macrophages. *In vivo*, we treated Swiss mice for 5 consecutive days with 8 mg of Glucantime intraperitoneally (IP) or intramuscular (IM) and obtained the peritoneal macrophages. We evaluated in these macrophages their phagocytic capacity (using fluorescent beads) and microbicidal action (intracellular amastigotes of *L. braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*), production of nitric oxide (Griess reagent) and cytokine profile (CBA method). The results showed that at concentrations up to 20 mg / ml, Glucantime did not alter the viability of macrophages *in vitro*. Phagocytic capacity and NO production did not change with Glucantime treatment. When previously treated with Glucantime, macrophages demonstrated increased microbicidal capacity for *T. cruzi*, but without direct correlation with NO production under the conditions tested. Glucantime-treated macrophages demonstrated increased production of TNF and IL-6, but after infection with *L. braziliensis*, TNF and IL-6 levels decreased as well as IL-10 levels in a dose-dependent manner. However, the TNF / IL-10 ratio showed a tendency to the inflammatory profile of the macrophages being infected or not. In macrophages from animals treated *in vivo* with Glucantime, both IP and IM, we observed a tendency to increase proinflammatory cytokines, being confirmed by the ratio TNF / IL-10 ($p < 0.05$). Macrophages from animals treated with the IM path showed increased microbicidal capacity for intracellular amastigotes of both *L. braziliensis* ($p < 0.05$) and *T. cruzi* ($p < 0.05$), without correlation with NO production in the conditions tested. These results suggest that Glucantime is able to modulate macrophages to a proinflammatory state that may contribute to the antiparasitic effect of the drug.

Keywords: Glucantime. Macrophage. Immunomodulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Classificação morfológica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2-	Esquema de classificação taxonômica da <i>Leishmania</i>	20
Figura 3-	Distribuição geográfica mundial das Leishmanioses.....	22
Figura 4-	Vetores das Leishmanioses.....	24
Figura 5-	Representação esquemática das formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp.....	25
Figura 6-	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	27
Figura 7-	Manifestação clínica da leishmaniose visceral.....	29
Figura 8-	Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar americana cutânea.....	30
Figura 9-	Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar cutânea difusa.....	30
Figura 10-	Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar cutânea disseminada.....	30
Figura 11-	Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar mucosa.....	32
Figura 12-	Origem dos macrófagos.....	33
Figura 13-	Heterogeneidade de macrófagos.....	36
Figura 14-	Viabilidade de macrófagos tratados com Glucantime.....	51
Figura 15-	Produção de citocinas por macrófagos tratados <i>in vitro</i> com Glucantime.....	53
Figura 16-	Produção de citocinas por macrófagos tratados <i>in vitro</i> com Glucantime e posteriormente infectados.....	54
Figura 17-	Produção de citocinas por macrófagos peritoneais oriundos de animais tratados com Glucantime pela via intraperitoneal.....	56
Figura 18-	Produção de citocinas por macrófagos peritoneais oriundos de animais tratados com Glucantime pela via intramuscular.....	57
Figura 19-	Efeito do tratamento intramuscular com Glucantime na atividade microbicida de macrófagos frente à infecção <i>in vitro</i> com <i>L. braziliensis</i>	59
Figura 20-	Efeito do tratamento intramuscular com Glucantime na atividade microbicida de macrófagos frente à infecção <i>in vitro</i> com <i>T. cruzi</i>	60
Figura 21-	Macrófagos tratados com Glucantime antes da infecção com <i>T. cruzi</i>	61
Figura 22-	Macrófagos tratados com Glucantime após a infecção com <i>T. cruzi</i>	62
Figura 23-	Proliferação de linfócitos T em animais tratados intramuscular	

	Glucantime.....	63
Figura 24-	Produção de citocinas de linfócitos de camundongos tratados intramuscular com Glucantime.....	64
Figura 25-	Produção de óxido nítrico(NO) em macrófagos tratados <i>in vitro</i> com Glucantime.....	65
Figura 26-	Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados <i>in vivo</i> com o Glucantime.....	66
Figura 27-	Análise da capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com Glucantime.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Ammonium Chloride Potassium Lysing Buffer
CBA	Cytokine Beads Array (Ensaio de citocinas por beads)
ConA	Concanavalina A
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HBSS	Solução balanceada de Hank
H2DCFDA	(2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína)
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
kDNA	DNA do cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmanione tegumentar americana
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ([brometo de 3-(4,5dimetil-2 tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazólio])
NO	Nitric oxide (óxido nítrico)
PBS	Solução Tampão Salina Fosfato
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SbV	Antimônio pentavalente
SbIII	Antimônio trivalente
SFB	Soro fetal bovino

TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
Th1	T helper 1 (T auxiliar 1)
Th2	T helper 2 (T auxiliar 2)
TMB	Tetrametilbenzeno
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	42
1.1	Objetivo geral	42
1.2	Objetivo específico	42
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	Parasitos	43
2.1.1	<u><i>Leishmania braziliensis</i></u>	43
2.1.2	<u><i>Trypanossoma cruzi</i></u>	43
2.2	O Fármaco	44
2.3	Considerações éticas	44
2.4	Obtenção da monocamada de macrófagos peritoneais	44
2.5	Obtenção de linfócitos a partir do baço	45
2.6	Avaliação da viabilidade de macrófagos	45
2.7	Dosagem de citocinas	46
2.8	Produção de óxido nítrico	46
2.9	Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos	47
2.10	Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos	48
2.10.1	<u>Infecção com <i>Leishmania braziliensis</i></u>	48
2.10.2	<u>Infecção com <i>Trypanossoma cruzi</i></u>	48
2.11	Tratamento de camundongos com Glucantime	49
2.12	Análises estatísticas	50
3	RESULTADOS	51
3.1	Viabilidade de macrófagos tratados com Glucantime <i>in vitro</i>	51
3.2	Avaliação da produção de citocinas após o tratamento <i>in vitro</i>	51
3.3	Avaliação da produção de citocinas em macrófagos oriundos de camundongos tratados <i>in vivo</i> com Glucantime	52
3.4	Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos oriundos de camundongos tratados intramuscularmente com Glucantime	58
3.5	Efeito do tratamento <i>in vitro</i> de macrófagos com Glucantime no índice de infecção com <i>T. cruzi</i>	60
3.6	Proliferação de linfócitos T	62

3.7	Avaliação da produção de citocinas de linfócitos oriundos de camundongos tratados de forma intramuscular <i>in vivo</i> com Glucantime.....	63
3.8	Avaliação do efeito do Glucantime na produção de óxido nítrico pelos macrófagos.....	65
3.9	Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos que foram tratados <i>in vivo</i> com o Glucantime.....	65
3.10	Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos.....	66
4	DISCUSSÃO.....	68
	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

Doenças tropicais negligenciadas

“Doenças tropicais negligenciadas” (DTNs) é um termo que remete às doenças que afetam, incapacitam e atingem principalmente as regiões da África Sub-saariana, Ásia e América Latina. São doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários, sendo a prevalência dessas doenças inversamente proporcional ao índice de desenvolvimento humano (Lindoso *et al.*, 2009; Utzinger J *et al.*, 2012; Mackey TK *et al.*, 2014). Elas são responsáveis por altos índices de mortalidade e morbidade em todo mundo, levando em torno de 500 mil a 1 milhão de mortes anualmente (TDR, 2010; Valverde R. <https://agencia.fiocruz.br/especiais>).

O termo “negligenciadas” corresponde não somente à falta de políticas públicas de saúde adotadas pelos governos, mas também das indústrias privadas investirem em pesquisa para melhoria de tratamentos e diagnóstico. Mesmo sendo essas doenças responsáveis por uma parte significativa do número de pessoas doentes mundialmente (11% da carga global de doenças) há poucos avanços nas pesquisas destinadas a elas. Um estudo mostrou que em 25 anos foram disponibilizados no mercado 1556 novos medicamentos e que menos de 2% deles foram desenvolvidos para as DTNs. Entre 2000 e 2011 dos 850 produtos desenvolvidos e aprovados somente 4% deles eram indicados para o tratamento das DNTs (DNDi,2012).

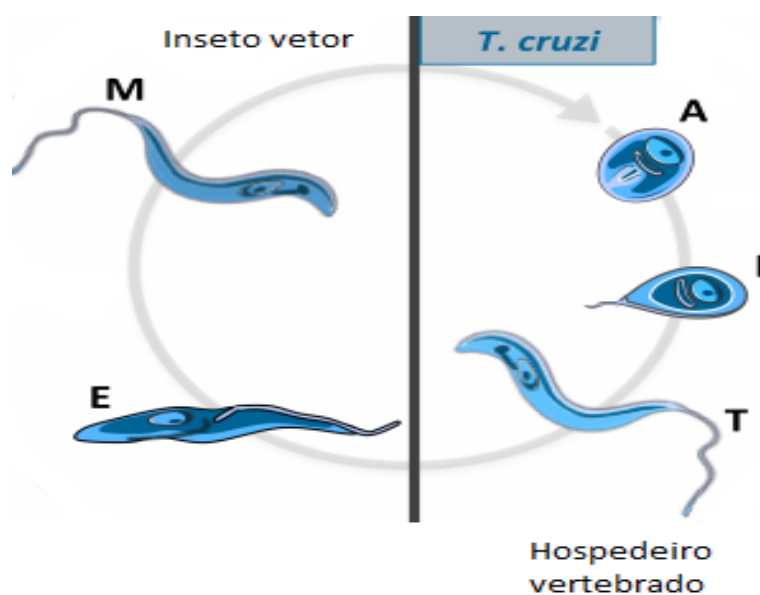
As leishmanioses e a doença de Chagas estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo e são importantes endemias brasileiras, causadas por protozoários tripanosomatídeos (DNDi,2012).

Família Trypanosomatidae

Essa família é constituída por protozoários que apresentam uma única e grande mitocôndria e também possuem uma estrutura denominada cinetoplasto, que contém o DNA mitocondrial (kDNA). Os protozoários da família Trypanosomatidae apresentam um único flagelo aparente ou acoplado ao seu corpo celular. Possuem estruturas celulares similares, mas diferentes formas evolutivas durante o ciclo de vida as quais são classificadas em função da

localização do cinetoplasto e base do flagelo em relação ao núcleo (Stuart *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2013; Bartholomeu *et al.*, 2014). Os gêneros de maior importância médica são *Trypanosoma* e *Leishmania*. No primeiro gênero, temos como principal espécie no Brasil o *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas ou tripanossomíase americana (Bartholomeu *et al.*, 2014). A doença de Chagas apresenta um curso clínico compreendendo uma fase aguda e uma fase crônica, que pode cursar assintomática (indeterminada) e/ou sintomática (forma cardíaca ou digestiva) (Castro *et al.*, 2006; Pinazo *et al.*, 2010; Sperandio da Silva *et al.*, 2014; Menna-Barreto, 2019). O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas principais durante seu ciclo, sendo duas delas presentes no hospedeiro vertebrado e a outra presente no inseto vetor (triatomíneos). A forma epimastigota é uma forma flagelada encontrada no inseto vetor e capaz de se replicar. A forma tripomastigota apresenta uma extensa membrana ondulante ao longo do corpo celular, onde na porção anterior da célula emerge o flagelo livre, sendo encontrada nas fezes do triatomíneo e no sangue do hospedeiro vertebrado. Essa forma é incapaz de se multiplicar, mas é a forma infectante e responsável pela disseminação do parasito no corpo do hospedeiro vertebrado infectado. A terceira forma evolutiva, a amastigota, é arredondada ou oval, sem flagelo aparente e é capaz de se multiplicar intracelularmente nos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (Neves, 2011; Bartholomeu *et al.*, 2014; Pérez-Molina *et al.*, 2018).

Figura 1 - Classificação morfológica do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A: amastigota; E: epimastigota; I: intermediária entre amastigota e tripomastigota sanguínea; M: tripomastigota metacíclica e T: tripomastigota sanguínea.

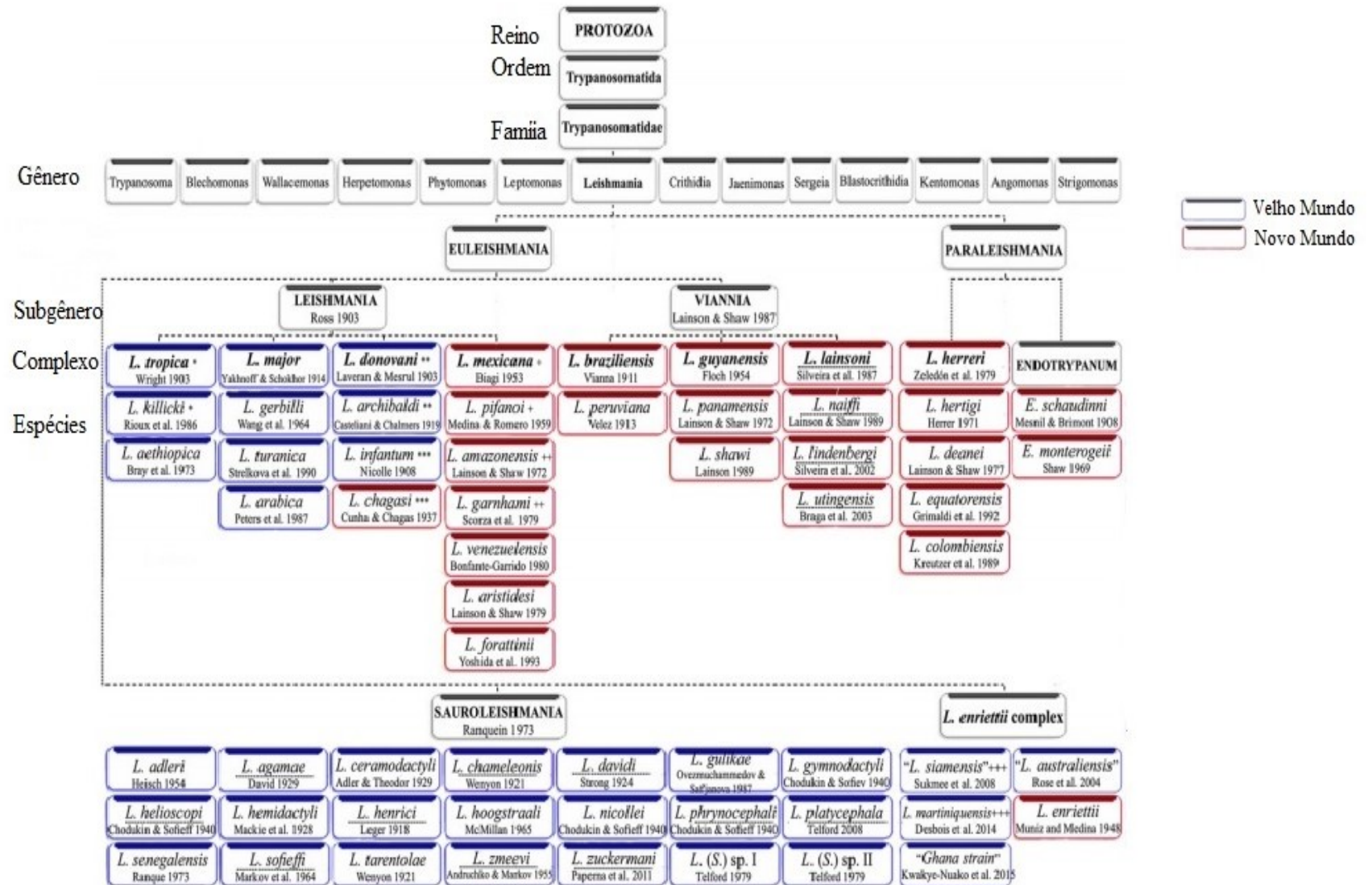
Fonte: Adaptado de Marchese *et al.*, 2018.

Embora o *T. cruzi* seja considerado uma única espécie, o parasito apresenta grandes variações (cepas), sobretudo relacionadas à sua virulência. A cepa Y, por exemplo, apresenta uma agressividade que, quando inoculada em camundongos, levam à morte. Devido a essa propriedade, essa cepa teve uma caracterização diferenciada, tendo os parasitos um estável e constante ciclo de vida em animais de laboratório, produzindo resultados padronizados de histopatologia, o que faz com que seja ideal para estudos experimentais, como por exemplo, eficácia de fármacos e protocolos de tratamento (Pinto *et al.*, 1999; Neto *et al.*, 2010).

A doença de Chagas apresenta um curso clínico que compreende uma fase aguda e uma fase crônica, que pode cursar assintomática (indeterminada) e/ou sintomática (forma cardíaca ou digestiva). A terapêutica disponível é extremamente limitada, com apenas dois fármacos disponíveis, que são tóxicos e eficazes apenas quando administrados na fase aguda, o que torna o tratamento ainda mais restrito, uma vez que grande parte dos indivíduos diagnosticados encontram-se na fase crônica (Castro *et al.*, 2006; Pinazo *et al.*, 2010; Sperandio da Silva *et al.*, 2014; Menna-Barreto, 2019).

No gênero *Leishmania* encontramos diversas espécies que levam a diferentes formas clínicas da leishmaniose (Figura 2) (Bartholomeu *et al.*, 2014).

Figura 2 - Esquema de classificação taxonômica da *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Akhoundi *et al.*, 2016.

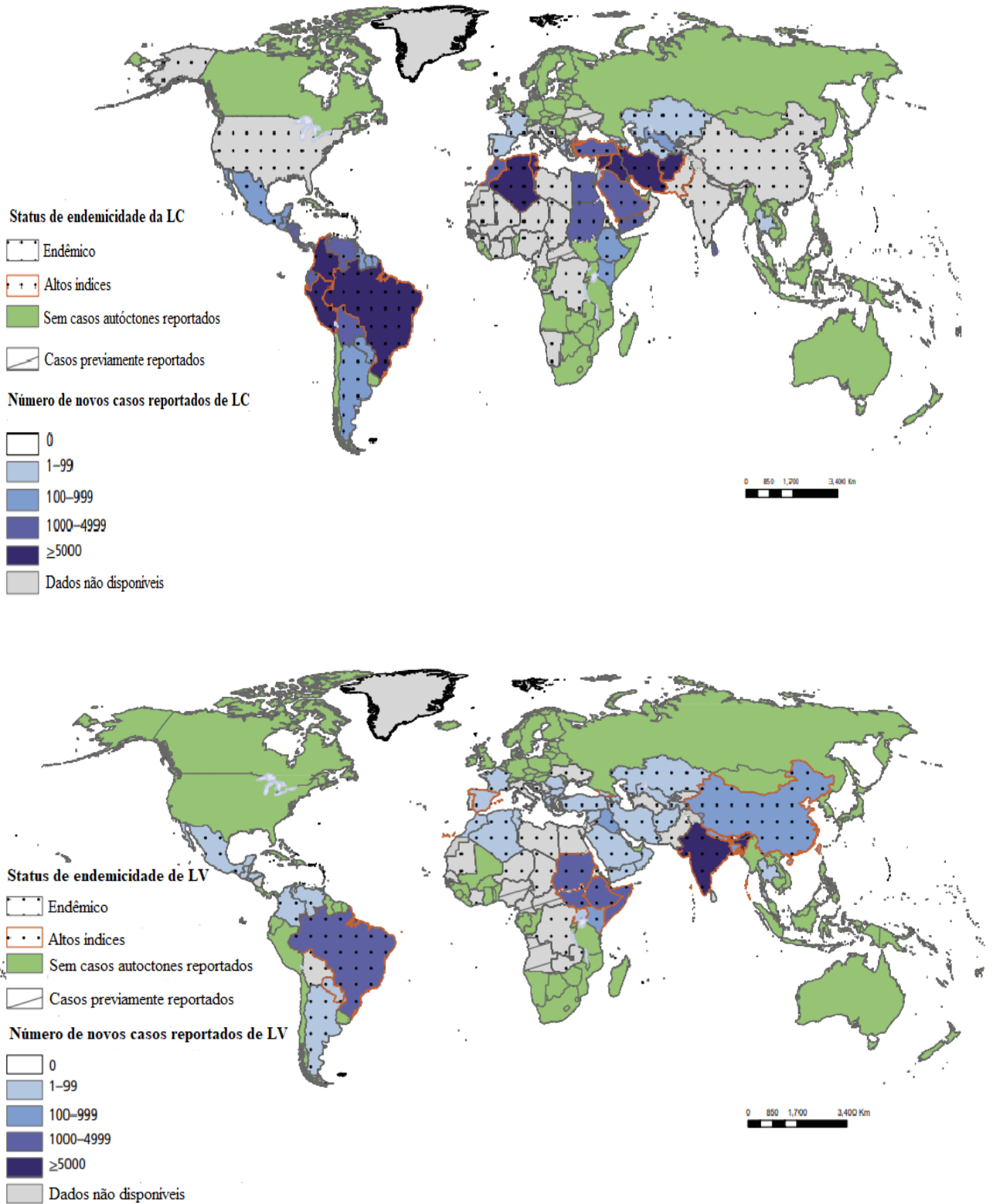
As Leishmanioses

As leishmanioses abrangem um grupo de doenças causadas por espécies do gênero *Leishmania* e transmitidas por insetos flebotomíneos. As variadas formas clínicas, como a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) resultam de uma associação entre as espécies do parasito com a resposta imune do hospedeiro. (Lindoso *et al.*, 2009; DNDi,2012; OMS 2015).

Estudos epidemiológicos das leishmanioses mostram que atualmente existem 98 países endêmicos nas regiões tropicais, subtropicais e no Mediterrâneo, com incidência anual de aproximadamente 1,8 milhão de casos, com aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas. Deste montante, cerca de 1,3 milhão corresponde à leishmaniose cutânea (LC) (Figura 3A) e cerca de 500 mil à leishmaniose visceral (LV) (Figura 3B). Esses dados podem ser ainda mais significativos, pois muitos casos não são notificados em função de dificuldades de diagnóstico e também pelos pacientes apresentarem coinfeções, principalmente com o HIV. Somente no ano de 2015, quase a totalidade de novos casos de ambas as formas clínicas de leishmaniose diagnosticados e reportados a Organização Mundial de Saúde foram oriundos de apenas 6 países, dentre eles o Brasil, que somente em 2014, registrou a ocorrência de 20418 novos casos de leishmaniose (DNDi,2012; Alvar *et al.*, 2012; Di Muccio *et al.*, 2015; WHO,2015; OPAS/OMS, 2016; Akhoundi, M. *et al.*, 2016; Lockard *et al.*, 2019).

Figura 3 - Distribuição geográfica mundial das Leishmanioses

A



Legenda: Mapa mundial demonstrando a endemicidade e número de novos casos de LC e LV ao redor do mundo.

Fonte: Adaptado de WHO, 2017.

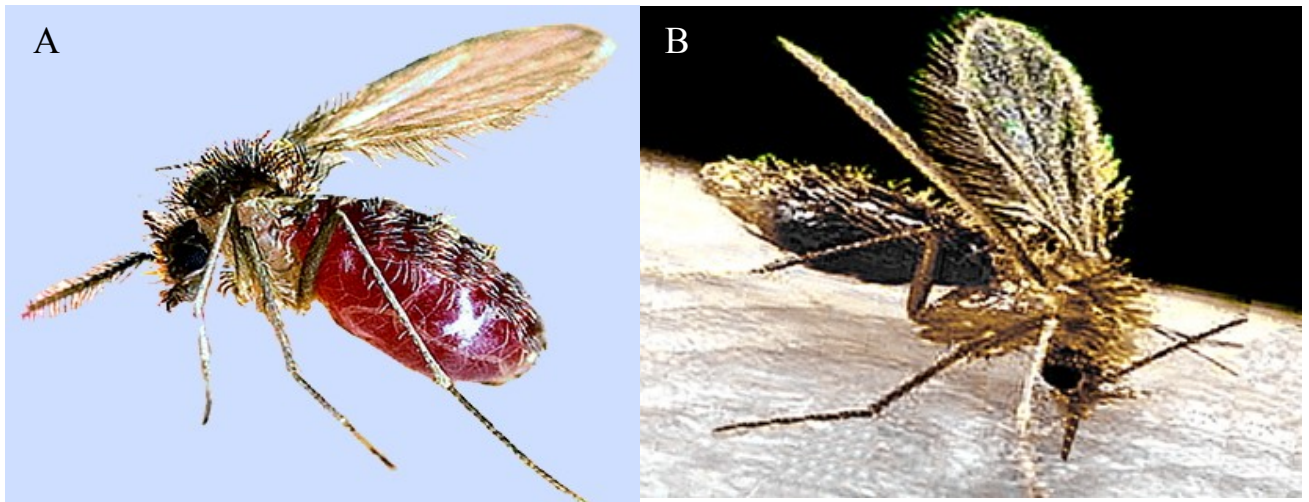
O Brasil está entre os 7 países responsáveis por mais de 90% de incidência mundial de casos de LV e entre os 9 países que somam quase 75% dos casos notificados mundialmente de LC, representando um grave problema de saúde pública (Den Boer *et al.*, 2011; Alvar *et al.*, 2012; Akhoundi *et al.*, 2016; DNDi, 2016; Moreira *et al.*, 2017). Desde 2003, no nosso país, a leishmaniose está presente em todos os estados, sendo a forma tegumentar a mais predominante com incidência anual de 28 mil casos. No período de 2000 a 2010 foram registrados cerca de 282 mil casos no país, sendo a região Norte com o maior percentual de registros (Gonçalves Neto *et al.*, 2013; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014). Cerca de 5,7% de LC no país evoluem para a forma mucosa, sendo a *L.(V.) braziliensis* a espécie mais comumente envolvida em ambas as formas (Reveiz *et al.*, 2013).

A leishmaniose visceral é endêmica em 88 países, sendo a *Leishmania infantum* a espécie causadora da doença nas Américas, presente em 12 países (da Rocha *et al.*, 2018). Os casos de LV no Brasil estão espalhados por 21 estados e se concentram na região Nordeste, atingindo principalmente crianças. Noventa por cento dos casos notificados de LV nos países do continente americano são oriundos do Brasil (Menon *et al.*, 2016). Em 2011 foram registrados mais de 3.800 casos no país com 6,7% evoluindo para o óbito (DNDi, 2012).

Vetores das leishmanioses

As leishmanioses são transmitidas de forma vetorial através da picada de insetos hematófagos fêmeas, denominados flebotomíneos, os quais pertencem a família Psychodidea, subfamília Phlebotominae. Dois gêneros desse inseto são responsáveis pela transmissão do parasito aos hospedeiros vertebrados, sendo eles no Novo Mundo o gênero *Lutzomya* (Figura 4A) e no Velho Mundo, *Phlebotomus* (Figura 4B). Trinta espécies diferentes do flebotomíneo são capazes de transmitir a *Leishmania*, durante o repasto sanguíneo (Brasil, 2017; Ghorbani e Farhoudi, 2018).

Figura 4 - Vetores das Leishmanioses



Legenda: Foto dos vetores das Leishmanioses: (A) Flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*; (B) flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*.

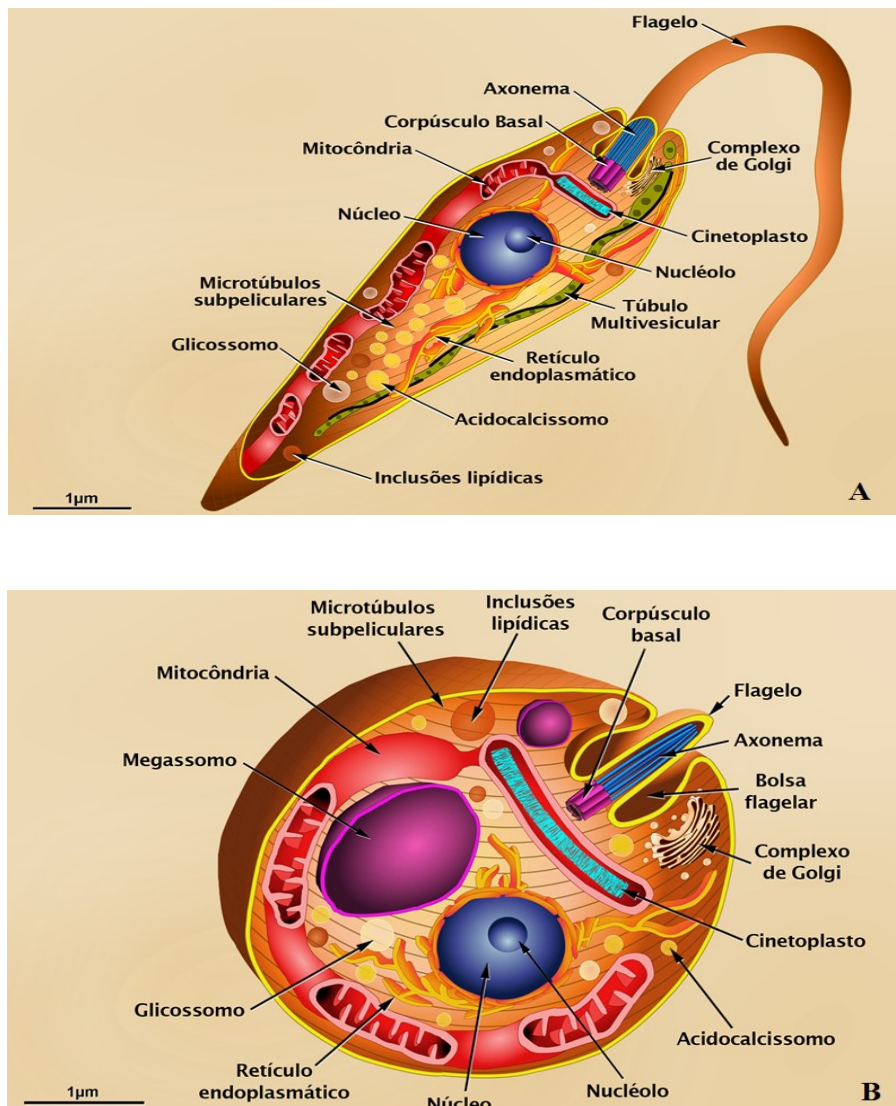
Fonte: disponível em: <http://www.faculty.ucr.edu/~legnerref/medical/sandflies.htm>

A *Leishmania* e o seu ciclo biológico

O gênero *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas distintas durante o seu ciclo biológico: promastigota e amastigota. A promastigota é a forma do parasito que se encontra no trato digestivo do inseto vetor infectado, apresenta formato alongado, medindo em torno de 16-40 μ m de comprimento, incluindo o flagelo que é aparente e livre, que surge da porção anterior do parasito. Seu núcleo é arredondado e a localização do cinetoplasto é anterior a ele, próximo a bolsa flagelar. Essa forma apresenta 2 estágios morfológicos dentro do hospedeiro invertebrado: (1) promastigota procíclica, a qual tem capacidade proliferativa dentro do intestino do inseto, (2) promastigota metacíclica, a forma infectante ao hospedeiro vertebrado, originada a partir do processo de metaciclogênese das formas procíclicas (Figura 5A). Já a forma amastigota, é uma forma replicante intracelular obrigatória que é encontrada geralmente dentro de vacúolos no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado. Ela é arredondada ou ovóide, não possui flagelo livre e sim um flagelo rudimentar que é encontrado dentro do corpo celular. Seu núcleo é grande e arredondado, possui cinetoplasto e uma estrutura denominada megassomo, que não é encontrada em promastigotas. O megassomo é uma estrutura

comparada aos lisossomos por digerirem qualquer molécula que seja internalizada pelo parasito através de endocitose. (Figura 5B). (Rey, 2010; Teixeira *et al.*, 2013; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014).

Figura 5 - Representação esquemática das formas evolutivas da *Leishmania spp.*



Legenda: (A) Forma promastigota; (B) Forma amastigota.

Fonte: Teixeira *et al.*, 2013.

O gênero *Leishmania* ainda apresenta uma divisão em dois subgêneros: subgênero *Leishmania* e subgênero *Viannia* (Figura 2). Esses subgêneros são classificados de acordo com o desenvolvimento das formas promastigotas dentro do intestino do inseto vetor, sendo o subgênero *Leishmania* se desenvolvendo no intestino médio e anterior do vetor e o subgênero *Viannia* apresentando desenvolvimento na porção posterior do intestino médio do vetor (Cupolillo *et al.*, 2000; Neves, 2005; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014). De acordo com

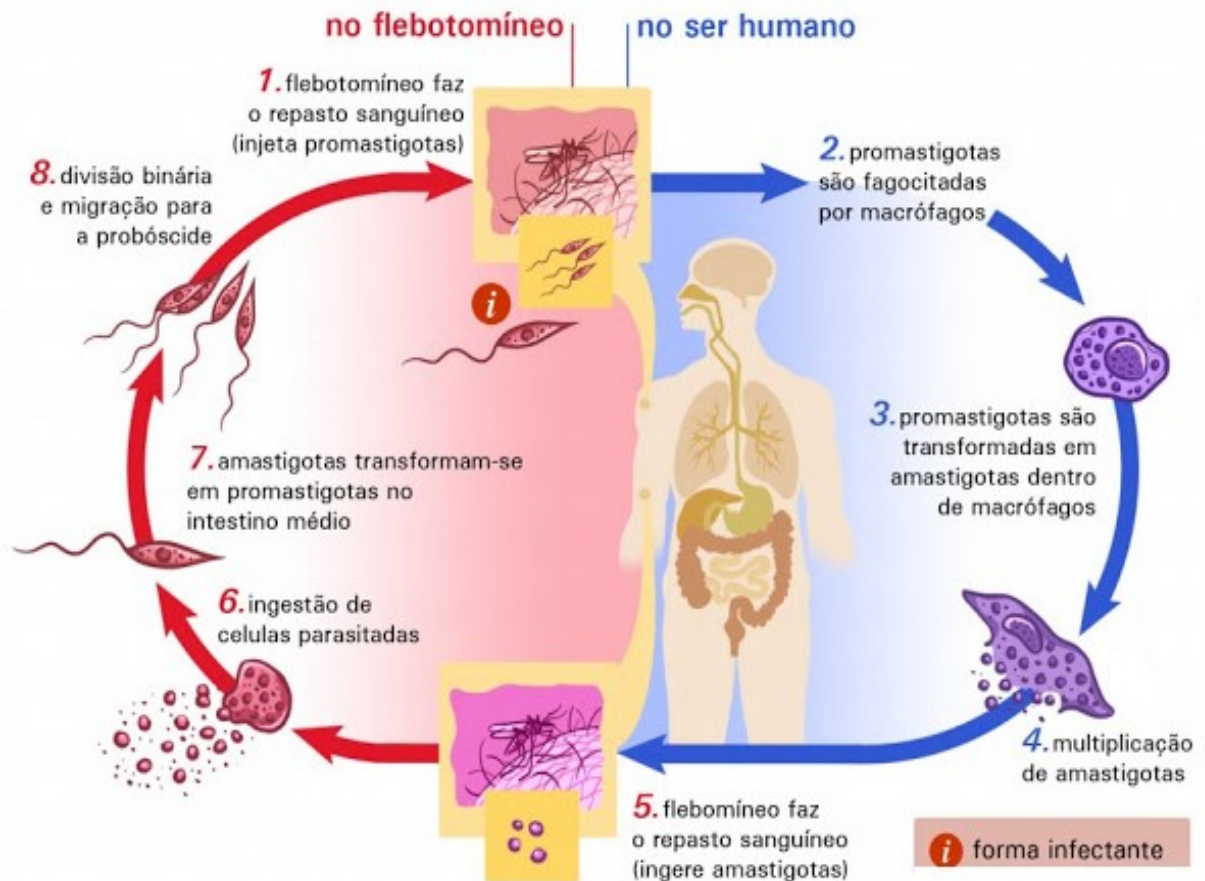
Shaw e Laison (1972), dentro desses subgêneros, ocorre ainda a divisão em 3 complexos (Figura 2). O complexo "*Leishmania braziliensis*" apresenta espécies encontrados somente nas Américas que têm grande facilidade de se disseminarem por várias partes do tegumento. É nele que está incluída a principal espécie causadora da leishmaniose tegumentar no Brasil, a *Leishmania (V.) braziliensis*. O complexo "*Leishmania donovani*" é o que abrange espécies de parasitos com a maior capacidade de causar a leishmaniose visceral por ter um tropismo por células do sistema mononuclear fagocítico de órgãos internos, principalmente baço, fígado e medula óssea. O complexo "*Leishmania mexicana*" apresenta a *Leishmania (L.) amazonensis* como a espécie de maior importância no Brasil. No complexo "*Leishmania major*" se encontra a *Leishmania (L.) major*, principal espécie causadora de leishmaniose tegumentar no Velho Mundo. Dentre as 53 espécies de leishmania, 31 podem infectar os mamíferos, sendo 20 delas de grande importância médica, por causar doença no homem por milênios (Bates, 2007; Rey, 2010; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014; Akhoundi *et al.*, 2016; Barrat *et al.*, 2017).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são heteroxênicos e para o seu desenvolvimento biológico ser completo necessitam passar por mais de um hospedeiro, sendo um invertebrado, o flebotomíneo, e o outro vertebrado, que pode ser o homem ou outro mamífero, incluindo animais domésticos (Rey, 2010; Votýpka *et al.*, 2015).

Durante o repasto sanguíneo das fêmeas do flebotomíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ocorre ingestão do sangue e das formas amastigotas presentes no tecido do local da picada (Figura 6). As amastigotas começam o processo de diferenciação em promastigotas, que se aderem ao epitélio intestinal, começam sua divisão binária e posteriormente sua diferenciação em formas metacíclicas, por um processo denominado metaciclogênese. Os promastigotas metacíclicos então se dirigem para a porção anterior do intestino médio, atingindo o proventrículo onde causam um bloqueio. Para se alimentar o inseto regurgita os parasitos o que permite a transmissão (Barral, 2011). As formas metacíclicas depositadas no hospedeiro vertebrado são então fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, principalmente pelos macrófagos. Dentro do fagolisossomo formado pela célula, as formas metacíclicas sofrem o processo de diferenciação para a forma amastigota, que é capaz de resistir à ação das enzimas lisosomais e se multiplica por divisão binária (Figura 6). Quando repleta de amastigotas a célula se rompe liberando assim as formas amastigotas, que podem ser mais uma vez fagocitadas pelos macrófagos adjacentes e assim difundir a infecção (Cunningham, 2002; Stuart *et al.*, 2008;

Cheuka *et al.*, 2016). O ciclo continua quando um novo inseto vetor realiza o repasto sanguíneo nesse hospedeiro e ingere as formas amastigotas do parasito (Figura 6).

Figura 6 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Legenda: Representação esquemática do ciclo evolutivo da *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de <http://bioligadosblog.blogspot.com.br/2015/09/ciclos-resumidos-de-doencas-causadas.html>

Formas clínicas e imunopatogênese das leishmanioses

As leishmanioses podem se manifestar nos seres humanos de diferentes maneiras, dependendo da espécie do parasito, das características do vetor, da resposta imunológica e da genética do hospedeiro. As manifestações clínicas variam desde hospedeiros assintomáticos, a pessoas com pequenas feridas ulceradas ou não, que podem evoluir para cura espontânea (lesões autolimitadas), até lesões que podem desfigurar as mucosas e infecções sistêmicas que

podem levar ao óbito se não tratadas. Dependendo da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, pode levar tanto ao controle da infecção quanto ao dano tecidual (Arboleda *et al.*, 2013; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014; Gollob *et al.*, 2014). Na leishmaniose tegumentar americana (LTA), a doença acomete a pele e, eventualmente, as mucosas, sendo classificada pelas características clínicas e imunopatológicas em grupos, sendo eles: subclínico, cutâneo localizada, recidiva cútis, mucosa, mucocutânea, difusa e disseminada (Arboleda *et al.*, 2013; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014; Gollob *et al.*, 2014).

Na leishmaniose visceral (LV) ou calazar, os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear das vísceras, acometendo órgãos como o baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides. A LV é a forma mais grave, com quadros de febre recorrente, hepatoesplenomegalia, palidez, perda de peso, leucopenia, plaquetopenia e anemia, podendo levar o paciente ao óbito nos casos onde não ocorre tratamento (Figura 7) (Rey, 2010; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014; Ghorbani e Farhoudi, 2018). Em pacientes com a LV ativa, ocorre a produção de um perfil misto de citocinas, como IL-10 (Interleucina 10), IL-6 (Interleucina 6), IFN- γ (Interferon gama) e TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta). Níveis aumentados de IL-10 sugerem um efeito na diminuição da ativação das células T e inibição das células apresentadoras de antígeno (APC) e um bloqueio da atividade inflamatória exercida pelo IFN- γ , levando assim, a uma cronicidade da infecção (Caldas *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2012; Gollob *et al.*, 2014).

Figura 7 - Manifestação clínica da leishmaniose visceral



Legenda: Foto de um paciente com Leishmaniose Visceral

Fonte: Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana -Ministério da Saúde, 2010.

Em indivíduos com quadro subclínico de LTA, não há aparecimento de nenhuma lesão. Porém, o teste imunológico usado no diagnóstico, a intradermoreação de Montenegro, que avalia a resposta imune celular, é positiva nesses pacientes (Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014). Em indivíduos com leishmaniose cutânea localizada (CL), que é a forma mais comum, a lesão se desenvolve no local da picada do flebotomíneo, após um período de incubação que varia de 15 dias a três meses. Inicialmente surge uma lesão nodular, que pode evoluir ou não para uma lesão ulcerada, com as bordas elevadas, bem limitada e indolor (Figura 8). Observa-se um balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias que, em certos casos, possibilita cura espontânea (McGwire *et al.*, 2013; Pereira-Carvalho *et al.*, 2013; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014).

Figura 8 - Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar americana cutânea



Legenda: Foto de ma lesão cutânea provocada pela Leishmaniose Cutânea Localizada
Fonte: Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana -Ministério da Saúde, 2010.

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma das formas raras da LTA apresentada por indivíduos anérgicos aos antígenos de *Leishmania*. Tem como característica a presença de inúmeras lesões nodulares sem ulceração (Figura 9), que se inicia de uma única lesão que se espalha pelo tegumento através da disseminação do parasito pelos vasos linfáticos e por migração de macrófagos infectados. Como consequência da ausência de resposta imune celular específica, na lesão encontra-se muitas amastigotas (Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014).

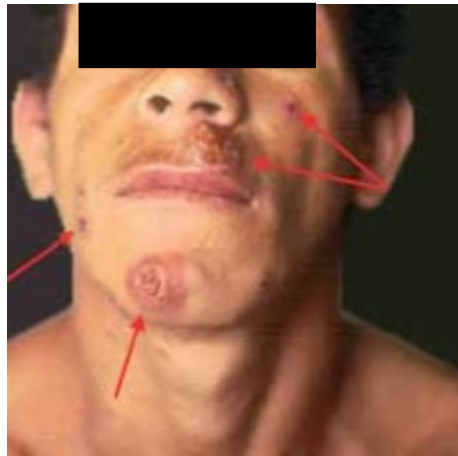
Figura 9 - Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar cutânea difusa



Legenda: Foto de um paciente com Leishmaniose Cutânea Difusa
Fonte: Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana -Ministério da Saúde 2010.

A leishmaniose cutânea disseminada (LD) é caracterizada por lesões ulceradas múltiplas, de aparência acneiforme em, no mínimo, 10 lesões e em diferentes regiões do corpo, podendo levar ao comprometimento das mucosas das vias aéreas. Os indivíduos apresentam anticorpos séricos anti-*Leishmania* em grande quantidade, presença de linfoproliferação específica e produção de IFN- γ (Figura10) (Barral, 2011; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014).

Figura 10- Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar disseminada



Legenda: Foto de múltiplas lesões provocadas pela Leishmaniose Cutânea Disseminada
Fonte: Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana -Ministério da Saúde, 2010.

Na leishmaniose mucosa (LM) ocorre o aparecimento de lesões na mucosa nasal e oral, com intenso processo inflamatório podendo levar à destruição tecidual e causar mutilações na face e comprometimento das funções respiratórias (Figura 11). Essa forma clínica pode ser secundária a uma lesão cutânea, que após meses a anos após da resolução, surge metástase para região oronasal. A *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais comumente associada a esta forma clínica da doença, que ocorre devido à hiperegia do sistema imune aos antígenos do parasito. Observa-se produção de elevados níveis de IFN- γ e TNF (Fator de necrose tumoral) e baixos níveis de IL-10, levando à exacerbação do processo inflamatório no hospedeiro (Barral, 2011; McGwire *et al.*, 2013; Conceição-Silva e Alves *et al.*, 2014).

Figura 11- Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar mucosa



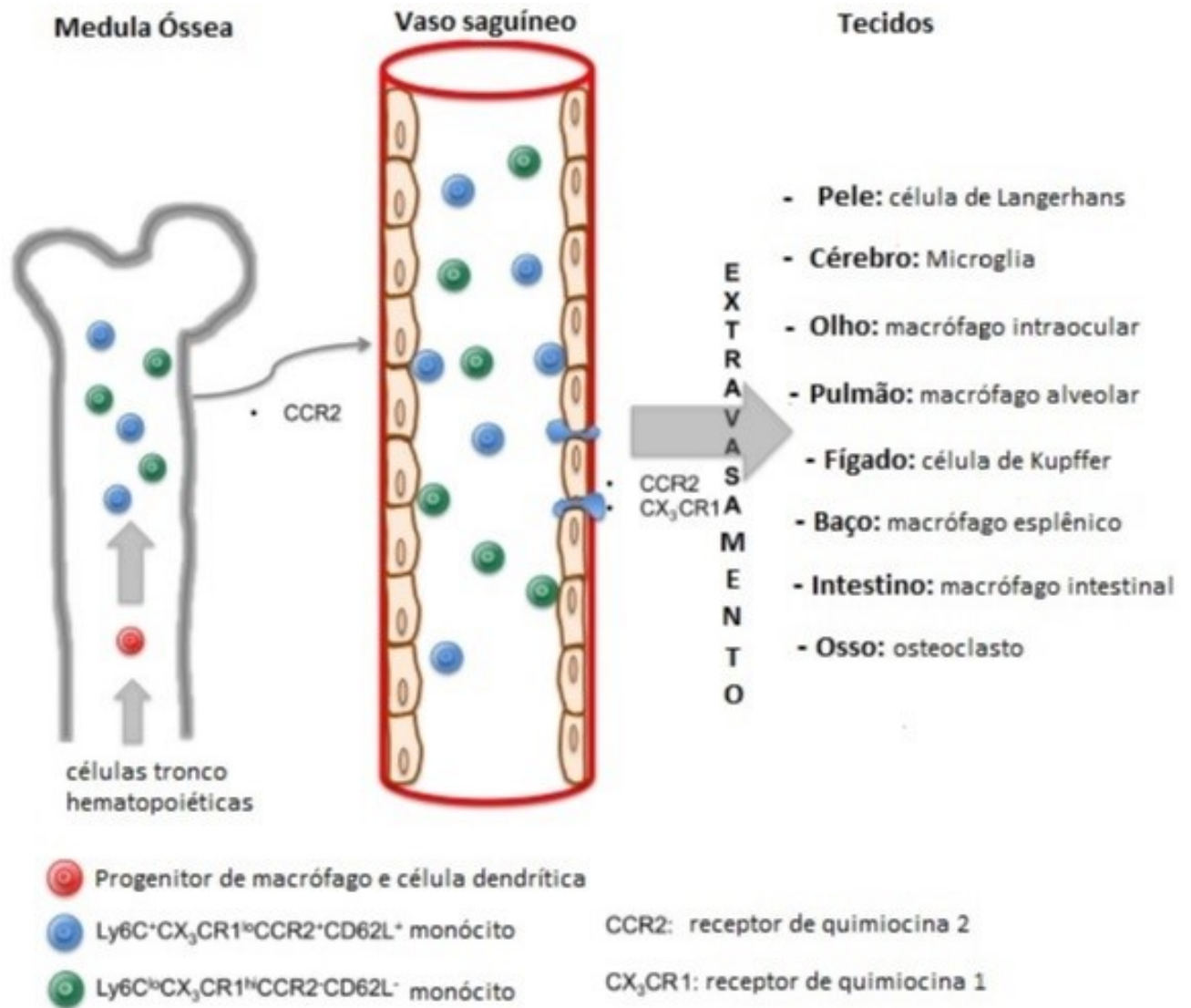
Legenda: Foto de um paciente com a lesão característica da Leishmaniose Mucosa
 Fonte: Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana-Ministério da Saúde, 2010.

A célula hospedeira: os macrófagos e sua origem

Os macrófagos fazem parte de uma família heterogênea de células fagocíticas profissionais, que engloba também os monócitos e células dendríticas. A maioria dos macrófagos são originados de células-tronco hematopoiéticas diferenciadas em monócitos. Porém existem macrófagos derivados de células-tronco hematopoiéticas durante o desenvolvimento embrionário, a qual não deriva de monócito, gerando assim, um tipo de macrófagos residentes, que preenchem todo o tecido, independente dos monócitos vindos da circulação (Duque & Descoteaux, 2015; Li *et al.*, 2017). Os monócitos são provenientes de precursores da medula óssea e se diferenciam através de estímulos como os fatores de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-3 e CCR2 (receptor de quimiocina 2). Dentro da circulação, o monócito pode ser amplamente categorizado em $Ly6C^{high}$ ou $Ly6C^{low}$, sendo as populações $Ly6C^{low}$ responsáveis pela “patrulha e pesquisa”, enquanto as populações $Ly6C^{high}$ são conhecidos como “monócitos inflamatórios” (Li *et al.*, 2017). Circulando pela corrente sanguínea, os monócitos ao serem recrutados por quimiocinas, por exemplo CCR2 e CX3CR1 (receptor de quimiocina 1 CX3) para os tecidos afim de reabastecer células de vida longa, originadas independentes da diferenciação de monócitos (células de Kupffer, macrófagos alveolares, de baço, peritônio etc.) ou em resposta a inflamação, atravessam a barreira capilar dos vasos e chegam aos tecidos, diferenciando-se em macrófagos. Essa diferenciação celular engloba o desenvolvimento das células em

tamanho e em número e o aumento da sua capacidade fagocítica (Figura 12) (Parihar *et al.*, 2010; Duque & Descouteaux, 2014; Chávez-Galán *et al.*, 2015).

Figura 12 - Origem dos macrófagos



Legenda: Figura esquemática demonstrando a origem e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em macrófagos.

Fonte: Adaptado de Chávez-Galán *et al.*, 2015.

Os macrófagos tem como função direcionar a resposta imunológica do hospedeiro de forma direta, pelo reconhecimento e eliminação de possíveis patógenos e de células mortas do organismo ou indiretamente orquestrando o tipo de função que outras células devem exercer, tais como os linfócitos, células endoteliais e fibroblastos. O macrófago também reaproveita os nutrientes oriundos da degradação de resíduos teciduais. Portanto, o macrófago é uma

importante célula que atua na manutenção da homeostasia dos tecidos (Davies *et al.*, 2013; Duque & Descouteaux, 2014; Shayam *et al.*, 2018). São células capazes de realizar quimiotaxia e ser direcionadas a qualquer local do organismo onde há um estímulo para elas. Podem ser ativadas por diversos estímulos, tais como o reconhecimento de PAMPS (padrões moleculares de reconhecimento de patógenos), por citocinas e quimiocinas, que são moléculas de sinalização importantes para desencadear a resposta imune, e antígenos reconhecidas por seus receptores específicos. As citocinas se ligam aos receptores de membrana de várias células, para assim exercer seus papéis orquestrando alguns processos, como regulação de genes, regulação da inflamação, proliferação celular e produção de outras citocinas (Duque & Descouteaux, 2014; Atri, Guerfali & Laouini, 2018).

Além da capacidade fagocítica, os macrófagos desempenham um papel central na inflamação e contribuem de forma importante na resposta imune inata e adaptativa. Geralmente estão entre as primeiras células que chegam ao local da infecção, sendo capazes de interferir nos processos imunes, participando da resolução da inflamação, cura do tecido e apresentação dos antígenos a outras células do sistema imune (Atri, Guerfali & Laouini, 2018). Essas células tem uma grande plasticidade fenotípica, podendo assumir os fenótipos propostos por Mills e colaboradores em 2000, denominados de M1, M2 e macrófagos regulatórios (MRs) (Figura 13). Os macrófagos classicamente ativados ou M1 são oriundos da ativação pela citocina IFN- γ (interferon gama) e se caracterizam por apresentar alta capacidade fagocítica, geração de espécies reativas de oxigênio, produção de óxido nítrico, resistência a patógenos e produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF (fator de necrose tumoral), interleucina 12 (IL-12), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 1 α (IL-1 α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 23 (IL-23) e a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias. Os macrófagos M1 também apresentam um aumento na capacidade de apresentação de antígenos, pelo aumento da expressão de MHC classe II, porém esse fenótipo pode contribuir para uma destruição tecidual. Macrófagos alternativamente ativados ou M2 são originados pela exposição à citocinas como interleucinas 4, 13, 21 e 33 (IL-4, IL-13, IL-21, IL-33). Esse tipo de macrófago é caracterizado pela alta produção de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) e TGF- β (Fator de transformação do crescimento β) e está envolvido na imunomodulação e manutenção da homeostasia relacionada a processos de cicatrização e remodelação tecidual. A ação da IL-4 nos macrófagos induz a atividade da arginase, enzima que converte a arginina a ornitina, que por sua vez é precursora de poliaminas e colágeno contribuindo para a formação de matriz extracelular e a cicatrização tecidual (Mosser & Edwards, 2009; Chávez-Galán *et al.*, 2015).

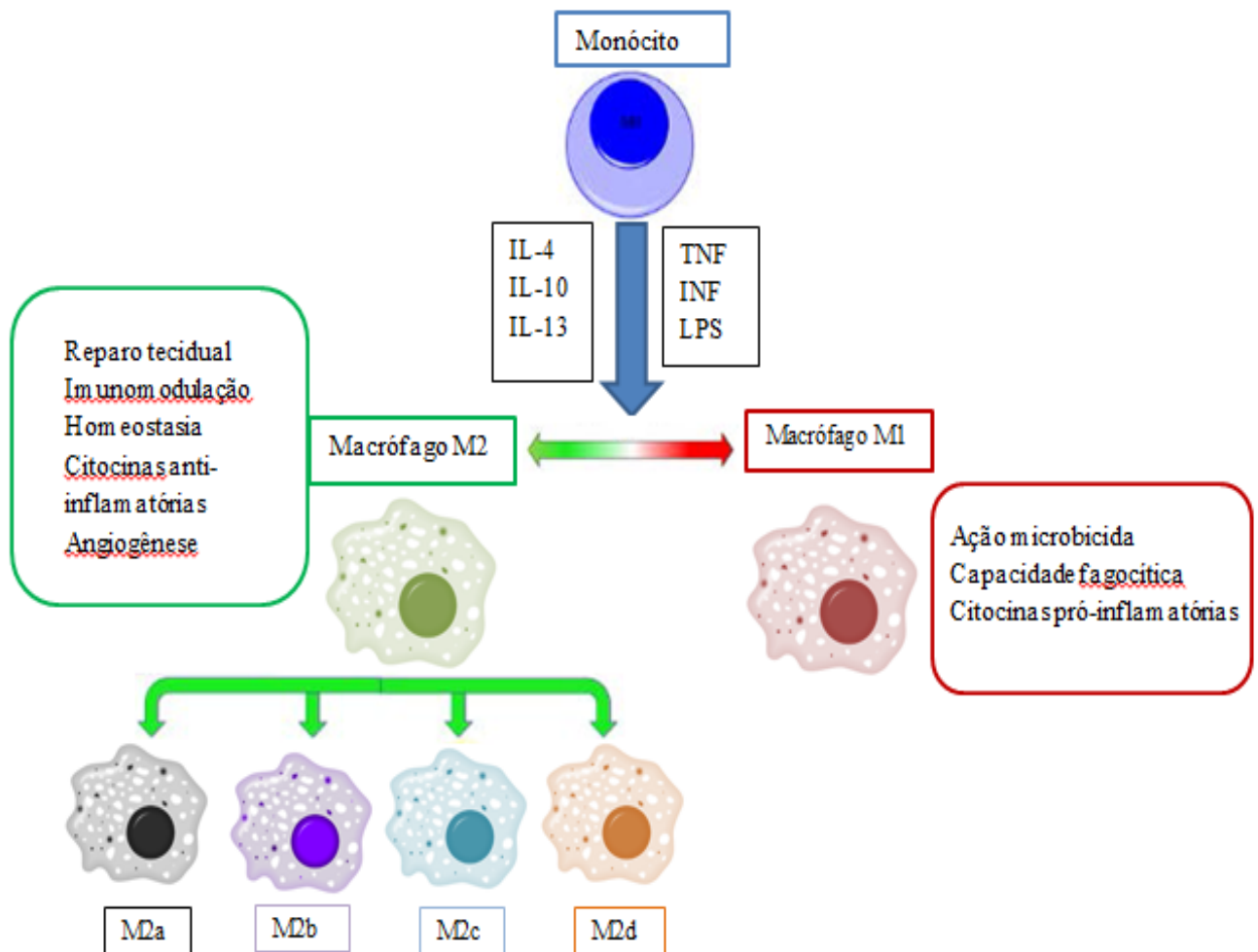
Por outro lado, a produção de poliaminas favorece a multiplicação de certos microrganismos intracelulares de macrófagos, tais como *Leishmania* spp. (Parihar *et al.*, 2010; Cruz-Guilloty *et al.*, 2014; Chávez-Galán *et al.*, 2015). Desse modo, os macrófagos M2 podem atuar em vários cenários, sendo reconhecidos quatro diferentes fenótipos, de acordo com o estímulo e função, sendo eles M2a, M2b, M2c e M2d (Figura 13). O fenótipo M2a é estimulado pela IL-4, IL-13, sendo responsável pela fibrinogênese, pelo reparo tecidual e por equilibrar a resposta imune do hospedeiro (Martinez *et al.*, 2008; Jones & Ricardo, 2013; Chistiakov *et al.*, 2015; Moghaddam *et al.*, 2018).

O fenótipo M2b é estimulado por LPS, IL1 β ou imunocomplexos, através da ligação em seus respectivos receptores na membrana dos macrófagos (TLR, IL-1R e FcR). São responsáveis por secretar citocinas anti e pró-inflamatórias, tais como IL-10, TNF, IL1 β , IL-6 e CCL1 e auxiliam a produção de anticorpos (Martinez *et al.*, 2008; Moghaddam *et al.*, 2018)

Macrófagos M2c são células que são estimuladas fenotipicamente pela IL-10, TGF β e glicocorticoidese responsáveis por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, pela produção de IL-10 e por promover a regeneração tecidual e angiogênese (Martinez *et al.*, 2008; Zizzo *et al.*, 2012; Duque & Descouteaux, 2014; Moghaddam *et al.*, 2018).

O quarto e último fenótipo oriundo de macrófago M2 é M2d, o qual é originado através de receptores de adenosina, que ao serem ativados, aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e estimula a angiogênese (Chistiakov *et al.*, 2015; Moghaddam *et al.*, 2018).

Figura 13 - Heterogeneidade de macrófagos



Legenda: Figura esquemática demonstrando a classificação de macrófagos de acordo com sua ativação “clássica” (M1) e “alternativa” (M2).

Fonte: Adaptado de Moghaddam *et al.*, 2018.

Nos estágios avançados de inflamação, a liberação de mediadores durante estresse, como glicocorticoides, contribuem para o aparecimento do fenótipo de macrófagos regulatórios (MRs), tendo esses macrófagos como característica a liberação de grandes quantidades da citocina anti-inflamatória IL-10 e consequente diminuição da produção de IL-12, o que os torna inibidores de processos inflamatórios e um novo tipo de macrófago que induz tolerância em transplantes (Mosser & Edwards, 2009; Atri, Guerfali & Laouini, 2018).

Os macrófagos podem desenvolver diferentes fenótipos de acordo com o tipo de processo inflamatório. Em tumores, as células do infiltrado inflamatório mais abundantes são os macrófagos, que podem adquirir um fenótipo com funções parecidas ao fenótipo M2, sendo essas células nomeadas como macrófagos associados a tumores (TAMs), as quais produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF β , diminuindo a ação anti-tumoral e

expressam fatores que levam a angiogênese, promovendo assim o crescimento do tumor. Os TAMs ajudam na metástase do tumor, através da capacidade de degradação da matriz extracelular, são células pobres em apresentar antígenos e bloqueiam a proliferação de células T (Martinez *et al.*, 2008; Moghaddam *et al.*, 2018; Parisi *et al.*, 2018; Shi & Shiao, 2018).

Na arteroesclerose, recentemente foi descrito um diferente fenótipo de macrófago que foi denominado macrófago Mox, que apresenta reduzida capacidade fagocítica e quimiotática, baixa expressão de receptor de manose e aumentada produção de IL-6 e TNF (Atri, Guerfali & Laouini, 2018). Esse fenótipo Mox ativa mecanismos dependentes de TLR-2 que geram um aumento da expressão de IL-1 β e COX-2, que é responsável pela inflamação (Chistiakov *et al.*, 2015; Parisi *et al.*, 2018).

Modulação de macrófagos no controle da Leishmaniose

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania* e são também as células efetoras finais que controlam esse tipo de infecção intracelular (Vieira *et al.*, 2013). Sendo o macrófago uma célula apresentadora de antígeno, a sua interação com os linfócitos T contribui para o direcionamento da imunidade celular e controle da infecção (Giudice *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2013). As citocinas liberadas pela célula apresentadora de antígenos durante essa interação com a célula T podem induzir a diferenciação desses linfócitos em uma ou mais das suas várias subpopulações. Essas subpopulações de linfócitos T produzem certos padrões de citocinas que por sua vez agem sobre o macrófago. Por exemplo, a produção de IL-12 pela célula apresentadora induz a diferenciação da célula T *naive* em Th1 (linfócito T helper 1) enquanto a produção da IL-4 pode induzir a diferenciação em Th2 (linfócito T helper 2). As células Th1 produzem IFN- γ que ativa os macrófagos gerando o fenótipo M1 que pode contribuir para controle de infecções intracelulares, tais como a infecção por *Leishmania* spp. A ativação dos macrófagos via IFN- γ leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF, CCL2(MCP-1) e a ativação da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzida), responsável pela produção de óxido nítrico (NO), o qual atua na eliminação do parasito. As células Th2, por sua vez, produzem citocinas do tipo IL-4 e IL-13 que induzem o fenótipo de macrófago M2, induzindo a ativação da enzima arginase que compete pelo mesmo substrato da iNOS, a L-arginina, levando a produção de poliaminas que

favorecem a replicação do parasito (Gomes-Silva *et al.*, 2007; Mosser & Edwards, 2009; Horta *et al.*, 2012; Chistiakov *et al.*, 2015; Atri, Guerfali & Laouini, 2018; Parisi *et al.*, 2018).

Embora a resposta do tipo 1 (Th1) seja fundamental para o controle da multiplicação intracelular de *Leishmania* spp., o balanço entre as citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias permite uma resposta imunológica mais equilibrada, promovendo o controle da leishmaniose com menor dano tecidual (Machado *et al.*, 2004; Atri, Guerfali & Laouini, 2018). De fato, a ativação de uma resposta do tipo 1 (Th1) é observada em todas as formas de leishmaniose. Entretanto, os indivíduos infectados com *L. (V) braziliensis* produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF. Apesar desse tipo de resposta ajudar a controlar a multiplicação do parasito, contribui para o desenvolvimento da lesão e, dependendo da intensidade, pode levar a um grande dano tecidual, como observado na LM (Machado *et al.*, 2004; Gomes-Silva *et al.*, 2007). Portanto, o equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória é fundamental para controle da infecção e restabelecimento da homeostasia.

Fármacos usados no tratamento das leishmanioses e seus mecanismos

O tratamento clássico das leishmanioses requer a administração de fármacos tóxicos e pouco tolerados (Tiuman *et al.*, 2011). Os medicamentos de primeira escolha para tratar a leishmaniose na maioria dos países, incluindo o Brasil, são os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) (Almeida & Santos, 2011). O seu uso na clínica é feito desde 1945 e são administrados por via intramuscular ou intravenosa. Os antimoniais pentavalentes apresentam efeitos colaterais, como complicações hepáticas, pancreáticas, renais, o que leva a dificuldades no tratamento (Pham *et al.*, 2013; de Aguiar *et al.*, 2018). Quando não há resposta terapêutica satisfatória com os antimoniais, são usados medicamentos de segunda linha, que são a anfotericina B e a pentamidina. A escolha do tratamento também pode variar de acordo com a forma clínica e a espécie do parasito envolvida na infecção (Arevalo *et al.*, 2007). A terapia medicamentosa local é uma alternativa que pode minimizar os efeitos tóxicos. A administração intralesional do fármaco já era usada no Velho Mundo e recentemente a Organização Panamericana de Saúde e o Comitê de Leishmaniose da OMS recomendaram a inclusão dessa via de tratamento no Novo Mundo (de Aguiar *et al.*, 2018; Ramalho *et al.*, 2018).

Os antimoniais pentavalentes são eficazes em amastigotas e geralmente são usados numa dosagem de 20 mg/kg/dia, por via intravenosa por 28 dias. No Brasil, a administração recomendada é de 10-20 mg/kg/dia em períodos que variam de 20 a 40 dias, dependendo da forma clínica apresentada pelo paciente. Para as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, sua eficácia varia de 30 a 90% (Strazulla *et al.*, 2013; Ministério da Saúde, 2013, 2014).

O Glucantime possui na sua molécula o antimônio pentavalente (SbV), mas a ação antiamastigota se dá principalmente pelo antimônio trivalente (SbIII). Existem duas hipóteses sobre onde ocorre a redução do antimônio. O antimonial pentavalente pode entrar na célula hospedeira, atravessar a membrana do fagolisossomo e ser então reduzido a forma trivalente (SbIII) ou pode ser reduzido ainda no citosol da célula (Rees, PH *et al.*, 1980; Kip *et al.*, 2018). Embora o mecanismo antiparasitário não esteja completamente elucidado, sabe-se que o SbIII compromete o potencial redox tiol do parasito, induzindo efluxo de tióis intracelulares e consequentemente inibindo a tripanotona redutase (Wyllie *et al.*, 2004). Sabe-se, também, que o SbIII eleva os níveis intracelulares de Ca^{2+} e gera estresse oxidativo, o que induz a apoptose da célula (Mookerjee Basu *et al.*, 2006; Frézard *et al.*, 2009; Kip *et al.*, 2018). Os antimoniais também agem induzindo diretamente danos no DNA do parasito (Lima *et al.*, 2010), inibindo a enzima DNA topoisomerase I (Chakraborty & Majumder, 1988) e provavelmente atua na inibição da glicólise e oxidação de ácidos graxos (Ghorbai & Farhoudi, 2018).

A anfotericina B é um antibiótico antifúngico poliênico que por ter alta afinidade por membranas contendo esteróis, interage com o ergosterol, um esteroide abundante na membrana do parasito e ausente na membrana de células de mamíferos, formando poros que interferem no balanço iônico, com perda de fluidos e causam a morte da célula. Sua administração é por via intravenosa e seu efeito tóxico se deve a uma pequena parcela do composto se ligar ao colesterol da membrana das células de mamíferos. Mostra-se eficaz na LTA cutânea e mucosa (Ourives-Neves *et al.*, 2011; Freitas-Junior *et al.*, 2012; Kip *et al.*, 2018). Formulações lipídicas (lipossomas) da anfotericina B melhoram sua biodisponibilidade e sua eficácia, diminuindo, assim, sua toxicidade. A utilização dessa formulação pode aumentar em 90% a eficácia do tratamento de LC e LV em um menor período. Na Índia esse tratamento mostra eficácia de até 90% nos casos de LV. No entanto, o alto custo dessas preparações inviabiliza seu uso em países em desenvolvimento, além de não ser estável em altas temperaturas (Murray *et al.*, 2005, Tiuman *et al.*, 2011; Ghorbani & Farhoudi, 2018).

A pentamidina é um derivado sintético da amidina, eficaz contra um grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania*, sendo capaz de comprometer o

metabolismo energético dos parasitos. Seu alvo celular não é conhecido, porém como permanece acumulada na mitocôndria acredita-se que aja nesta organela (Ourives-Neves *et al.*, 2011; Freitas-Junior *et al.*, 2012; Kip *et al.*, 2018). Embora possa ser usada como fármaco de segunda escolha em pacientes resistentes a antimoniais, sua alta toxicidade, baixa eficácia e severos efeitos adversos, como miocardite e insuficiência renal, pode limitar seu uso, como ocorreu na Índia, onde foi abandonada como tratamento para LV (WHO, 2010; Freitas-Junior *et al.*, 2012; Kip *et al.*, 2018).

A miltefosina está entre novas opções de tratamento e é o único fármaco administrado por via oral. Foi estudada primeiramente como um agente antitumoral e depois mostrou ter atividade leishmanicida *in vivo*. A miltefosina tem sido utilizada na Índia desde 1998 para o tratamento de LV (Vélez *et al.*, 2010) e foi licenciada na Alemanha para o uso em LC desde 2004 (Kip *et al.*, 2018), porém seu uso no Brasil foi autorizado em 2016 para tratar leishmaniose visceral canina (NOTA TÉCNICA Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA). O mecanismo de ação da miltefosina tem diversas vertentes, sendo uma delas de que o fármaco atua sobre o parasito, interferindo no seu metabolismo lipídico e causando morte por apoptose. Há indícios também que possa atuar em uma via de sinalização ligada a sobrevivência celular, que possa alterar a composição da membrana celular e ter efeitos imunomoduladores (Wadhone *et al.*, 2009; Ghorbani & Farhoudi, 2018; Dorlo *et al.*, 2012; Kip *et al.*, 2018).

Atividade imunomoduladora de fármacos usados na leishmaniose

Dentre os medicamentos usados na clínica para tratamento das leishmanioses, alguns apresentam não somente atividade direta sobre o parasito, mas também demonstraram alguma atividade imunomodulatória sobre o hospedeiro. Essa ação indireta inclui o direcionamento das células T e ativação de fagócitos que podem contribuir para o controle da infecção (Hartley *et al.*, 2013).

A Anfotericina B modula a ativação dos macrófagos infectados ou não com *Leishmania*, induzindo a produção de radicais tóxicos, como ROS e NO, e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF (Mukherjee *et al.*, 2010; Gosh *et al.*, 2013). Também já foi documentado que aumenta a capacidade citotóxica de células natural killer (NK) (Kim *et al.*, 2017).

Estudos de Ponte e colaboradores mostraram que a miltefosina aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos. Porém, quando esses macrófagos são infectados com *L. amazonensis* e incubados com o fármaco, há aumento da produção de NO (Ponte *et al.*, 2012). Trabalho de Gosh e colaboradores demonstrou que tanto macrófagos oriundos de camundongos tratados *in vivo*, como as células tratadas *in vitro* com 20 μ M de miltefosina apresentaram um aumento nos níveis de citocinas pró inflamatórias como IL-12 e TNF e também na sua capacidade de apresentar antígenos para as células T (Gosh *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos vêm sugerindo a atividade do Glucantime como possível imunomodulador de fagócitos. Em um estudo de Muniz-Junqueira e Paula-Coelho (2008), foi demonstrado que o antimonial pentavalente aumenta a capacidade fagocítica de monócitos e neutrófilos e a produção de TNF *in vitro* (Muniz-Junqueira & Paula-Coelho, 2008). Corroborando com esses achados, Saldanha e cols (2012) fizeram um estudo com células de pacientes com LTA tratados ou não com Glucantime, eles observaram que os monócitos dos indivíduos tratados tinham a sua capacidade fagocítica aumentada, bem como a produção de TNF. Um outro estudo, realizado por Gosh e colaboradores (2013), demonstrou que ao tratar camundongos BALB/c com uma dose única intravenosa de Pentostam houve um aumento nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-12 e TNF produzidas pelos macrófagos e demonstraram também aumento da capacidade dessas células de apresentar antígenos para as células T, evidenciado através de uma elevada produção da citocina IL-2. O tratamento dos macrófagos com o fármaco *in vitro* demonstrou níveis de produção de NO basais, como os encontrados nos macrófagos sem tratamento. Porém, quando as espécies reativas de oxigênio (ROS) foram mensuradas, constatou-se um aumento da sua produção em relação ao controle sem tratamento (Gosh *et al.*, 2013).

Esses dados não deixam claro o quanto a ação imunomoduladora desse fármaco influencia no controle da infecção. Sendo assim, dada a relevância dos antimoniais pentavalentes para o tratamento da leishmaniose, estudos quanto ao efeito imunomodulador do Glucantime são necessários para a compreensão mais ampliada dos seus mecanismos, possibilitando assim delinear seus alvos e conseqüentemente possibilitar expandir os usos terapêuticos.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do Glucantime (antimoniato de meglumina) sobre a funcionalidade de macrófagos.

1.2 Objetivos específicos

- a) Investigar o impacto do tratamento de macrófagos *in vitro* com Glucantime sobre o perfil de citocinas e a produção de óxido nítrico;
- b) Determinar se o tratamento dos macrófagos *in vitro* altera a sua capacidade fagocítica, assim como sua capacidade microbicida frente à infecção com *Leishmania braziliensis* e com *Trypanosoma cruzi*;
- c) Investigar se o tratamento *in vivo* de camundongos com o Glucantime, pelas vias intraperitoneal ou intramuscular é capaz de alterar as funções de macrófagos peritoneais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Parasitos

2.1.1 Leishmania braziliensis

Neste trabalho utilizamos a cepa Thor (MCAN/BR/98/R619), de *Leishmania braziliensis* isolada de cão, cedida pela Dr^a Léa Cisne pesquisadora do IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ.

Para manutenção, os parasitos foram inoculados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) no coxim plantar da pata traseira direita (1×10^6 promastigotas). Após 1 mês de infecção, os parasitos foram obtidos da lesão e mantidos em cultura como promastigotas a 28°C em meio Schneider (Sigma, Sant Louis, USA), acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), com repiques semanais até a quinta passagem. Após essa passagem, os parasitos eram novamente isolados de lesões de hamsters infectados.

2.1.2 Trypanosoma cruzi

Parasitos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram cedidos pelo grupo de pesquisa da Dra Marcia Cristina Paes do Laboratório de Interação de Tripanosomatídeos e Vetores-IBRAG/ UERJ. A manutenção de animais infectados (Swiss Webster machos) para obtenção de tripomastigotas sanguíneos foi feita realizando passagem semanal do sangue contendo o parasito para animais saudáveis. Os tripomastigotas sanguíneos foram inoculados intraperitonealmente (10^5 tripomastigotas) em camundongos. Para obtenção de tripomastigotas em quantidade suficiente para os experimentos, os camundongos infectados com o *T. cruzi* foram imunossuprimidos com ciclofosfamida (Genuxal) 200mg/kg via intraperitoneal após dois dias da sua infecção. No sétimo dia de infecção, eles foram eutanaziados e foi feita a coleta do sangue através de punção cardíaca usando citrato de sódio como anticoagulante. O sangue assim obtido foi transferido para tubos, centrifugados a 255G

por 22 minutos a 24°C e levados a estufa de 37°C por 20 minutos para que os parasitos migrassem para o plasma sanguíneo. O plasma foi então coletado para outro tubo e centrifugado a 2496G por 15 minutos a 24°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi parcialmente descartado, deixando uma pequena faixa de sobrenadante acima do sedimento, onde encontram-se os tripomastigotas. Essa região foi colhida e ressuspendida com meio RPMI (Cultilab) e 10% de SFB, e mantidos em gelo até o uso.

2.2 O Fármaco

Para o estudo foi utilizado o Glucantime (antimoniato de meglumina, Sanofi Aventis) cedido pelo Instituto Nacional de Infectologia (INI/FIOCRUZ).

2.3 Considerações éticas

Para os estudos com células murinas, manutenção de parasitos em animais e tratamento *in vivo* com Glucantime, os animais foram mantidos no biotério da disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. O estudo foi aprovado pela Comissão de ética para cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ Protocolos n° CEUA/027/2013 e renovado com n° CEUA/046/2017.

2.4 Obtenção da monocamada de macrófagos peritoneais

As células foram obtidas de camundongos Balb/c ou Swiss normais por lavagem peritoneal com 5 ml de meio RPMI gelado. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para 2×10^6 /ml e plaqueadas em placa de 24 poços (1ml/poço) com lamínulas de vidro estéreis no fundo. Para aderência foram deixados em atmosfera de 5% de

CO₂ a 37°C por 1 hora. Após esse período as células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI a 37°C (Jorge & Castro, 2000).

2.5 Obtenção de linfócitos a partir do baço

Os baços dos animais foram retirados cirurgicamente, pesados e macerados. As células foram centrifugadas a 459G durante 10 minutos a 4°C e o sedimento ressuspense em ACK (Ammonium Chloride Potassium Lysing Buffer), por cerca de um minuto para lise de hemácias, quando então foram lavadas em RPMI gelado. As células foram ajustadas para 2×10^6 /ml, plaqueadas (placas de 96 poços, 200 µl/poço e placas de 24 poços com 400µl/poço) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 48h para as placas de 24 poços e 72h para as placas de 96 poços. Após as 48 horas, as placas de 24 poços foram submetidas à centrifugação a 469G, por 10 minutos, e o sobrenadante das culturas foi colhido e armazenado no freezer -80°C para posterior dosagem de citocinas pelo método CBA (descrito no item 2.7). Nas placas de 96 poços, após as 72h foram adicionados 20µl de MTT [brometo de 3-(4,5dimetil-2 tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazólio] (5mg/ml em PBS), que é convertido em cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis. As placas foram incubadas por mais 3 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Para a revelação, as placas foram centrifugadas para remoção dos sobrenadantes e adicionou-se 100µl de DMSO (dimetilsulfóxido) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro de microplaca a 570nm.

O mitógeno Concanavalina A (Con A) (Sigma-Aldrich) foi usado como estímulo para proliferação de linfócitos T.

2.6 Avaliação da viabilidade de macrófagos

Para avaliação da viabilidade de macrófagos frente ao tratamento *in vitro* com Glucantime, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou Swiss foram obtidos (como descrito no item 2.4), aderidos em placas de 96 poços e incubados com diferentes concentrações de Glucantime por 48 horas. Após esse período, foi adicionado MTT (como

descrito no item 2.5) e a leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro de microplaca a 570nm.

2.7 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos foi realizada no sobrenadante das culturas usando o método *Cytometric Bead Array* (CBA). Foram utilizados o kit Mouse Inflammation (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70 - BD Biosciences Pharmigen, CA, EUA) para as citocinas de macrófagos e o kit Mouse Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10 – BD Biosciences Pharmigen, CA, EUA) para as citocinas produzidas por linfócitos, seguindo as recomendações do fabricante. Esse teste se baseia no uso de esferas de poliestireno marcadas com diferentes graus de fluorescência e recobertas com anticorpos específicos, que são detectados por citometria de fluxo e os resultados expressos em pg/ml.

Os tubos para a aquisição no citômetro foram montados com os sobrenadantes e com os padrões das citocinas usadas no kit. Em seguida, adicionamos as microesferas de captura que são recobertas com os anticorpos para cada citocina e, subsequentemente, com o anticorpo de detecção conjugado com o marcador ficoeritrina (PE) e deixados protegidos da luz em temperatura ambiente por 3 horas. A curva padrão foi realizada com o mesmo procedimento. Passado o tempo de incubação, em cada tubo foi adicionado 500 μ L de solução de lavagem e levados a centrifugação a 200G num tempo de 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspensionado com 300 μ L da solução de lavagem e levados ao citômetro de fluxo (FACS Canto II) para serem adquiridos os resultados. A análise foi feita utilizando o programa FCAP Array Software e os gráficos feitos a partir dessa análise no GraphPad Prism 5.

2.8 Produção de óxido nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico (NO), foi dosado nitrito (NO $_2^-$) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos utilizando o método de Griess (Green *et al*, 1982).

Em uma placa de 96 poços foram distribuídos 100µl de cada sobrenadante a ser analisado e 100µL do reagente de Griess (Solução A – 0,1g de N-(1 – naftil) etileno-diaminadiidrocloreto e Solução B – 2-amino benzene ssulfonamida), na proporção de 1:1 e as amostras foram incubadas por 15 minutos, no escuro em temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, as amostras foram analisadas em leitor de microplacas em uma densidade óptica de 570 nm. Os valores dos sobrenadantes foram comparados com os de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂), usando a equação da reta para obtenção da concentração de nitrito nos sobrenadantes.

2.9 Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos

Macrófagos peritoneais de camundongos obtidos como descrito no item 2.4, foram aderidos (2x 10⁶ células por ml) em câmaras Lab-Tek (Thermo Scientific) *overnight* em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e então foram tratados com as diferentes concentrações de Glucantime por 24 horas. Controles foram células incubadas somente com meio RPMI suplementado com 10% de SFB ou macrófagos tratados com LPS (lipopolissacarídeo) a 5µM. Após o tratamento, as monocamadas foram lavadas com PBS a 37°C e incubadas com microesferas de látex (*beads*) marcadas com FITC (Polysciences), na proporção de 3 *beads* por macrófago, durante 3 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C protegido da luz. Ao final da incubação, as monocamadas foram lavadas com PBS a 37°C e marcadas com DAPI. A lâmina da Lab-Tek foi montada com lamínula entre 10µl da solução de N-propilgalato (Sigma-Aldrich) para cada poço, com o intuito de manter a fluorescência emitida pelas microesferas. Para a visualização, imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E600, Japão) acoplado a uma câmera digital de captura de imagem (Nikon Digital Sight- DSV3). As *beads* internalizadas foram contadas em, no mínimo, 150 macrófagos por poço. Os resultados foram expressos em número de *beads* por macrófago e como índice fagocítico, usando a equação: % de macrófagos com beads X número de beads/ número total de macrófagos.

2.10 Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos

Para investigar se o tratamento prévio do macrófago com Glucantime era capaz de modular a sua capacidade de controlar uma infecção intracelular foi utilizado dois parasitos: *Leishmania braziliensis* e o *Trypanosoma cruzi*.

2.10.1 Infecção com *Leishmania braziliensis*

As monocamadas de macrófagos (obtidas como descrito no item 2.4) foram tratadas por 24 horas com Glucantime nas concentrações 0,1mg/ml, 1mg/ml e 10mg/ml. Após esse tempo, os sobrenadantes foram colhidos e congelados para posterior dosagem de nitrito e citocinas. Os macrófagos foram lavados uma vez com PBS morno (37°C) para retirada do fármaco. Em seguida, foi feita a infecção com promastigotas de *Leishmania braziliensis* na proporção de 5 parasitos por macrófago, durante 4 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Depois desse tempo de interação, os sobrenadantes foram desprezados e as monocamadas foram lavadas 5 vezes com PBS morno (37°C) para retirar as promastigotas que não conseguiram entrar nos macrófagos. As células foram, então, incubadas com meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino por mais 48 horas. Os sobrenadantes foram colhidos para posterior dosagem de citocinas e nitrito. As monocamadas de macrófagos foram fixadas e coradas com o corante Panótico rápido, e as amastigotas contadas em microscópio óptico (mínimo de 200 macrófagos). Os resultados foram expressos como índice de infecção (IF), utilizando a fórmula: $IF = \% \text{ de células infectadas} \times \text{número de amastigotas} / \text{número total de macrófagos}$.

2.10.2 Infecção com *Trypanosoma cruzi*

As monocamadas de macrófagos obtidas (como descrito no item 2.4) foram tratadas por 24 horas com Glucantime nas concentrações 0,1mg/ml; 1mg/ml e 10mg/ml. Após esse tempo, os macrófagos foram lavados uma vez com PBS morno (37°C) para retirada do

fármaco. Em seguida, foi feita a infecção dessas células com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* na proporção de 1 parasito por macrófago durante 18 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Depois desse tempo de interação, os sobrenadantes foram desprezados e as monocamadas foram lavadas 2 vezes com PBS morno (37°C) para retirar os parasitos não internalizados pelos macrófagos. As monocamadas foram, então, incubadas com meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino por mais 48 horas nas mesmas condições descritas anteriormente no item 2.10.1 para *L. braziliensis* e posterior avaliação do índice de infecção.

Adicionalmente, para averiguar se o Glucantime teria alguma ação sobre as amastigotas intracelulares do *T. cruzi*, o tratamento com o fármaco foi realizado após a infecção. As monocamadas foram preparadas e infectadas com tripomastigotas (proporção 1:1) por 18 horas. Após esse período, as monocamadas infectadas foram lavadas e submetidas ao tratamento com Glucantime por 48 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As monocamadas de macrófagos foram fixadas, coradas com o Panótico rápido e as amastigotas contadas em microscópio óptico (mínimo de 200 macrófagos). Os resultados foram expressos como índice de infecção (IF), utilizando a fórmula: $IF = \% \text{ de células infectadas} \times \text{número de amastigotas} / \text{número total de macrófagos}$.

2.11 Tratamento de camundongos com Glucantime

Para avaliar se o tratamento de camundongos com Glucantime afetava a funcionalidade dos seus macrófagos peritoneais residentes, camundongos Swiss machos ou fêmeas em idade entre 45-50 dias (5 animais/ grupo) receberam o fármaco por duas vias distintas: intraperitoneal ou intramuscular. Pela via intraperitoneal, o grupo controle recebeu 200 µl de PBS e o grupo tratado recebeu 8 mg (em 200 µl) de Glucantime (40 mg de Glucantime/Kg/dia) durante 5 dias consecutivos. Pela via intramuscular na coxa, o grupo controle recebeu PBS (30 µl) e o grupo tratado recebeu 8mg (30 µl) de Glucantime (40 mg de glucantime/Kg/dia) durante 5 dias consecutivos.

Ao final do tratamento, no sexto dia, os animais foram eutanasiados para obtenção das células. Os macrófagos peritoneais de cada animal foram retirados e as monocamadas preparadas (como descrito no item 2.4). Adicionalmente, o baço foi retirado para obtenção de linfócitos (como descrito no item 2.5)

2.12 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos *in vitro* foram analisados pelo teste ANOVA de entrada única com pós-teste de Tukey, utilizando o software “GraphpadPrism 5”. Valores de p iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

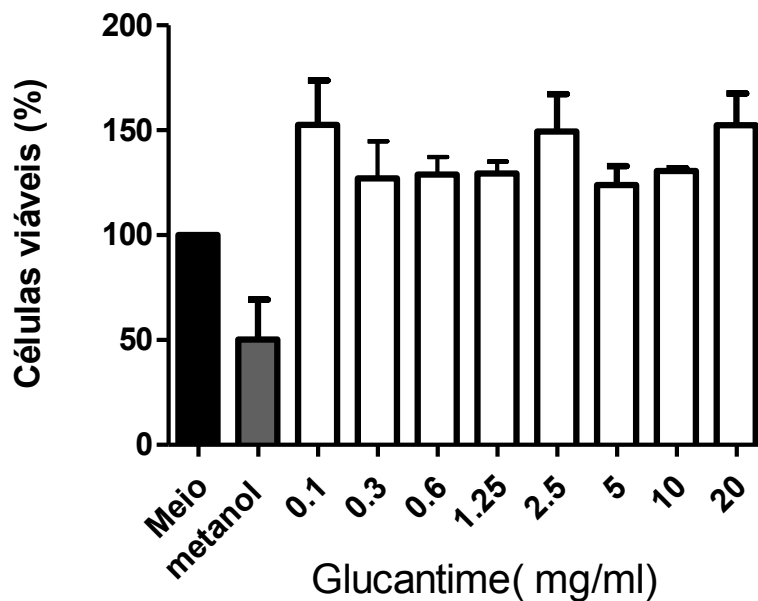
Os dados com animais *in vivo* foram analisados pelo teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Os valores de p iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativo. Os dados foram expressos como mediana.

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidade de macrófagos tratados com Glucantime *in vitro*

Inicialmente, analisamos se a faixa de concentração usada de Glucantime seria tóxica para os macrófagos. A viabilidade das células foi avaliada pelo método de redução do MTT, após tratamento com diferentes concentrações do Glucantime por 48 horas. Os resultados demonstraram que o tratamento não alterou a viabilidade dos macrófagos nas concentrações testadas (Figura 14).

Figura 14- Viabilidade de macrófagos tratados com Glucantime

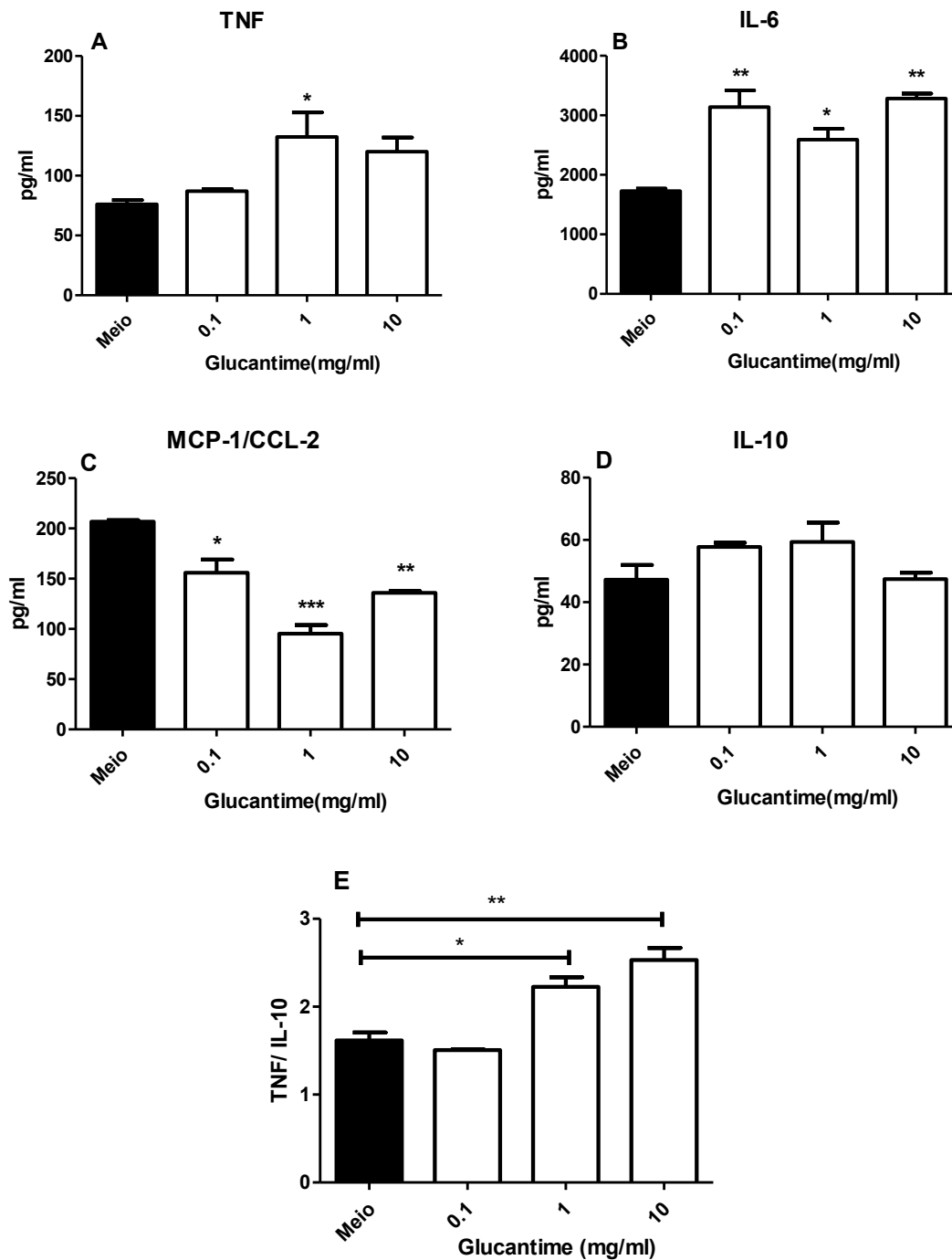


Legenda: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram aderidos em placas de 96 poços por 1 hora, tratados com diferentes concentrações do Glucantime e incubados por 48 horas a 37°C/ 5% CO₂. Controles foram incubados com meio RPMI ou metanol 100%. Depois desse período foi adicionado o MTT (5mg/ml) por 3 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados com a adição de DMSO e a leitura feita em espectrofotômetro a 570nm. Resultados foram expressos em porcentagem do controle.

3.2 Avaliação da produção de citocinas após o tratamento *in vitro*

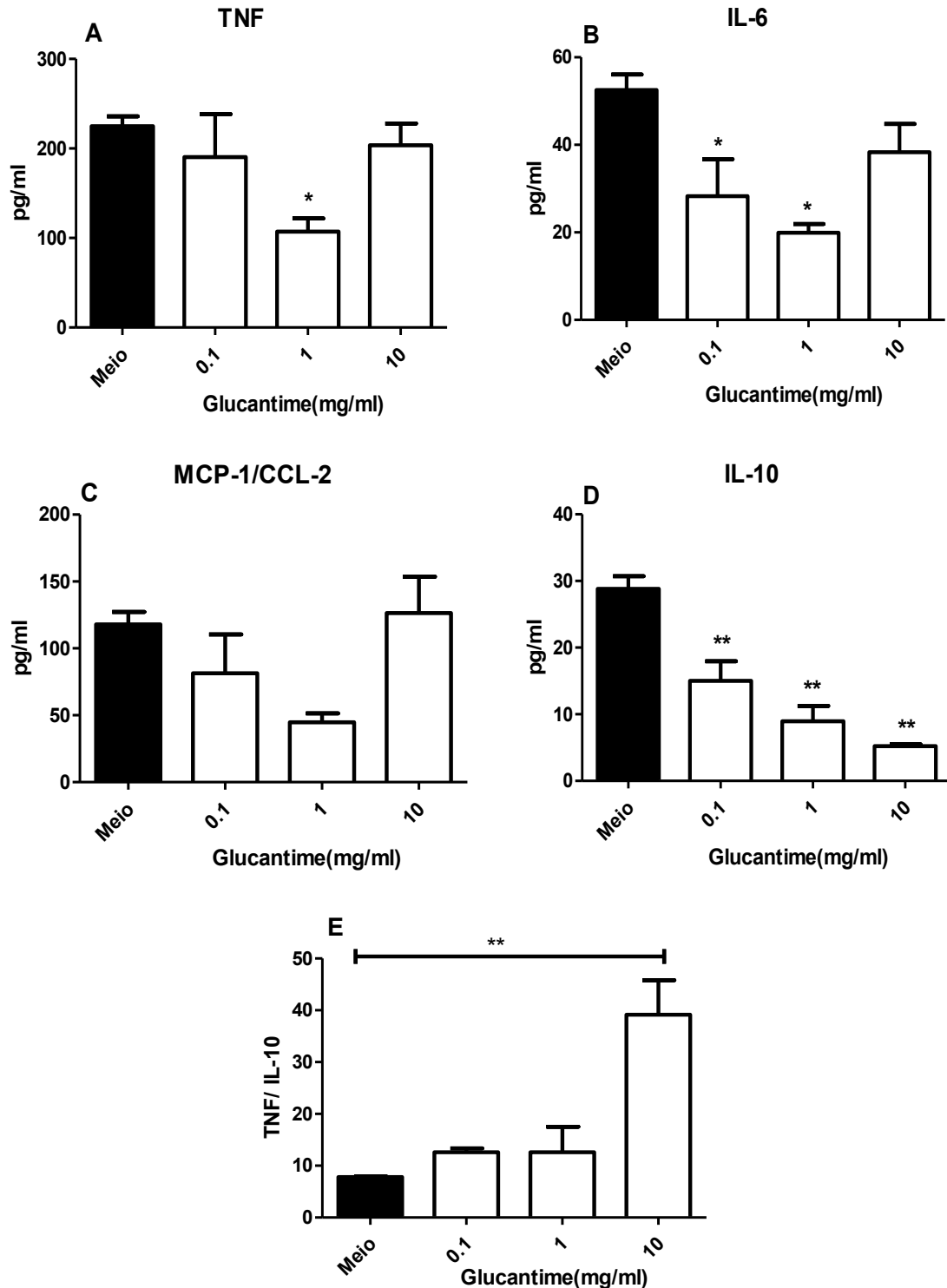
Com o objetivo de investigar se o Glucantime seria capaz de modular a produção de citocinas pelos macrófagos, as dosagens foram feitas nos sobrenadantes das culturas tratadas *in vitro* por 24h. Podemos observar que os macrófagos tratados com o Glucantime apresentaram níveis aumentados de TNF, sobretudo na concentração de 1mg/ml (Figura 15A). A produção de IL-6 foi significativamente aumentada nos macrófagos tratados com todas as concentrações de Glucantime (Figura 15B). Já os níveis de MCP-1/ CCL-2 foram significativamente diminuídos com o tratamento (Figura 15C). Entretanto, os níveis de IL-10 não sofreram alteração (Figura 15D). Quando os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* após o tratamento por 24h com Glucantime, ocorreu uma diminuição expressiva dos níveis de TNF (Figura 16A), principalmente na concentração de 1mg/ml, e também da citocina IL-6 nas concentrações de 0,1 mg/ml e 1 mg/ml (Figura 16B). Uma redução bastante significativa e dose-dependente ocorreu nos níveis de IL-10 (Figura 16D). Calculando a razão entre o TNF e a IL-10, podemos observar uma tendência para perfil mais inflamatório dos macrófagos tratados com Glucantime, estando ou não infectados (Figura 15E e 16E).

Figura 15 - Produção de citocinas por macrófagos tratados *in vitro* com Glucantime



Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de BALB/c foram tratadas com Glucantime por 24 horas, os sobrenadantes das culturas foram colhidos e a dosagem das citocinas foi feita com o Kit CBA. (A)- TNF. (B)-IL-6. (C)- MCP-1/ CCL-2. (D)- IL-10. (E)- Razão TNF/IL-10.

Figura 16 - Produção de citocinas por macrófagos tratados *in vitro* com Glucantime e posteriormente infectados

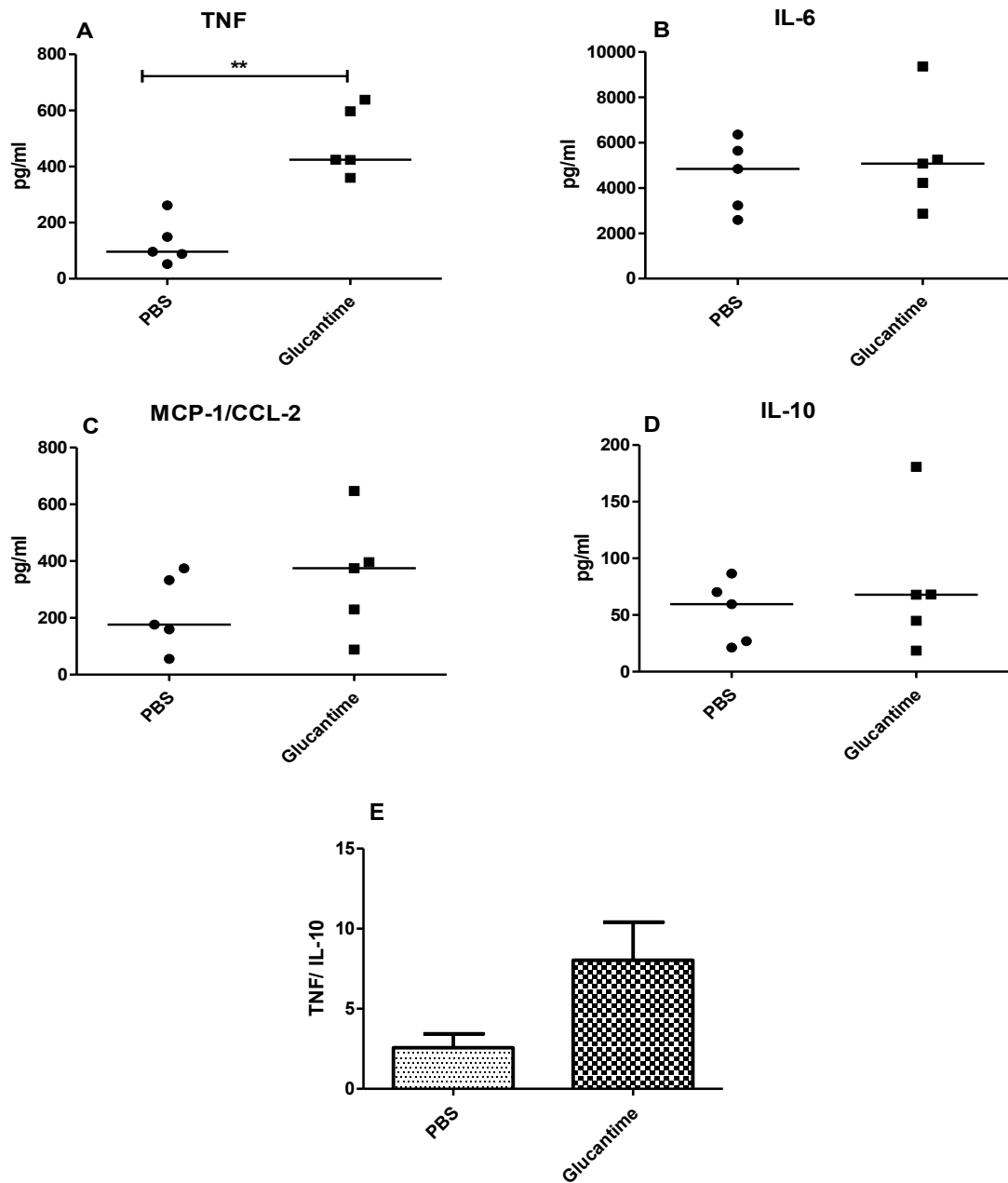


Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de BALB/c foram tratadas com Glucantime. Após 24 h, as células foram submetidas à infecção com *L. braziliensis* por 4 horas e então incubadas somente com meio RPMI suplementado com 10% de SFB por 48h a 37°C/ 5% CO₂. Os sobrenadantes foram colhidos e as citocinas foram dosadas com o kit CBA. (A)- TNF. (B)- IL-6. (C)- MCP-1/ CCL-2. (D)- IL-10.(E)- Razão TNF/IL-10.

3.3 Avaliação da produção de citocinas em macrófagos oriundos de camundongos tratados *in vivo* com Glucantime

Com o intuito de investigarmos se o tratamento *in vivo* de camundongos com Glucantime seria capaz de alterar a produção de citocinas pelos macrófagos, os animais foram tratados por cinco dias pela via intraperitoneal ou intramuscular. Ao final do tratamento, as monocamadas de macrófagos peritoneais foram obtidas e após 24h de cultura, as citocinas foram dosadas no sobrenadante. Nos animais tratados pela via intraperitoneal, os resultados mostraram que houve um aumento significativo nos níveis de TNF produzidos pelos macrófagos (Figura 17A), enquanto as outras citocinas avaliadas (IL-6, MCP-1 e IL-10), não apresentaram alterações significativas em relação ao controle (Figura 17 B, C e D). Quando calculamos a razão TNF/IL-10, podemos observar uma tendência para perfil mais inflamatório dos macrófagos oriundos de camundongos tratados com Glucantime (Figura 17 E).

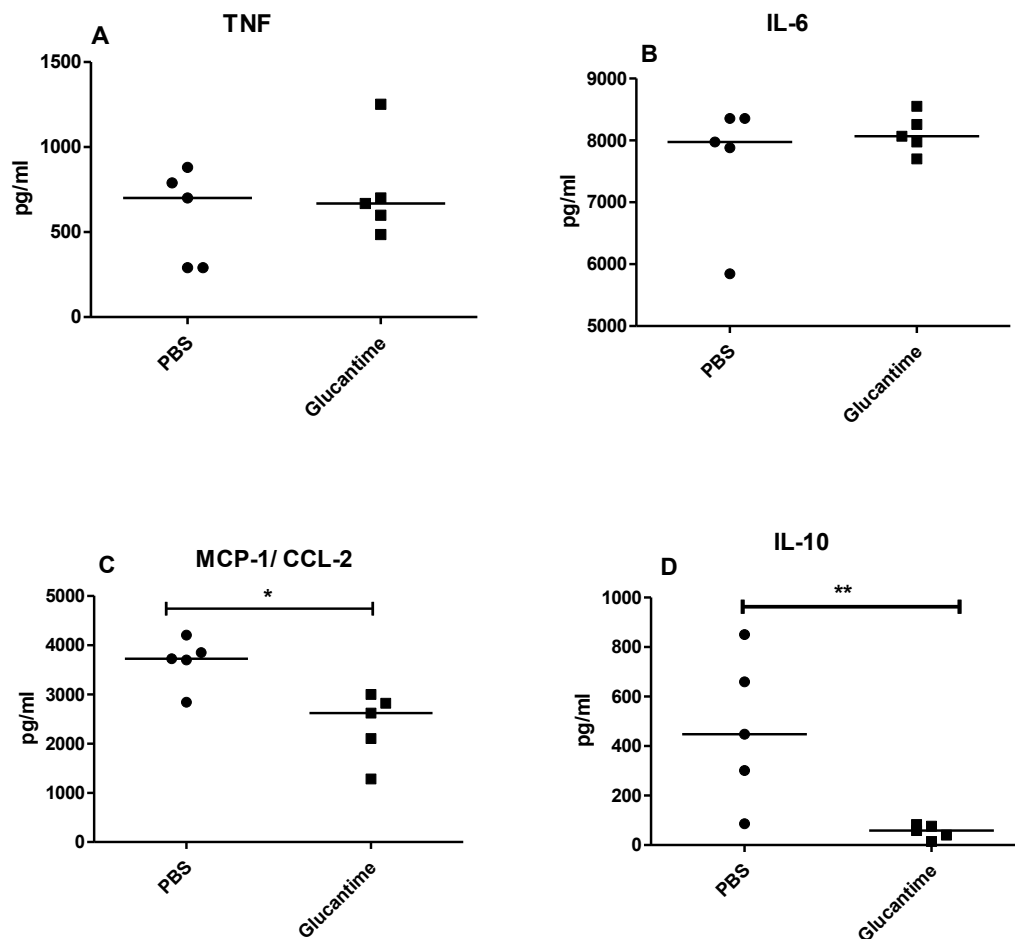
Figura 17 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais oriundos de animais tratados com Glucantime pela via intraperitoneal

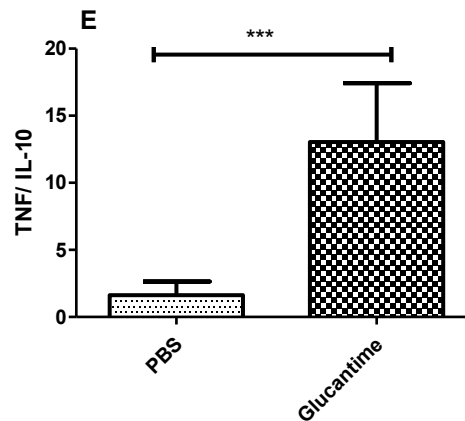


Legenda: Camundongos Swiss sadios receberam tratamento intraperitoneal com Glucantime (40mg/Kg) ou com PBS diariamente por 5 dias consecutivos. No sexto dia, os macrófagos peritoneais de cada animal individualmente foram aderidos e incubados *overnight* em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse tempo, os sobrenadantes foram colhidos e as citocinas foram dosadas através do Kit CBA. (A)- TNF. (B)- IL-6. (C)- MCP-1/ CCL-2. (D)- IL-10. (E)- Razão TNF/IL-10. ** p<0.01 (Teste t de student).

Já nos macrófagos oriundos dos animais que foram tratados com Glucantime pela via intramuscular, não observamos alteração na produção do TNF em relação aos macrófagos de animais controles tratados com PBS (Figura 18A). Entretanto, os resultados mostraram que houve uma diminuição nos níveis de MCP-1/ CCL-2 (Figura 18C) e da IL-10 (Figura 18 D) produzidos pelos macrófagos dos animais que receberam o tratamento com o Glucantime. A razão entre a produção de TNF e IL-10 mostrou haver significativa resposta inflamatória nos macrófagos oriundos de animais tratados com Glucantime (Figura 18E).

Figura 18 – Produção de citocinas por macrófagos peritoneais oriundos de animais tratados com Glucantime pela via intramuscular



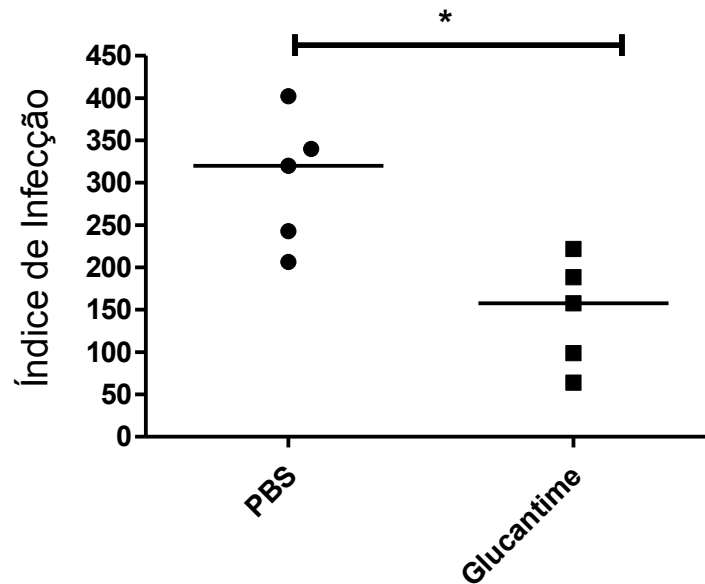


Legenda: C amundongos Swiss sadios receberam tratamento intramuscular com Glucantime (40mg/Kg) ou com PBS diariamente por 5 dias consecutivos. Os macrófagos peritoneais de cada animal individualmente foram aderidos e incubados *overnight* em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse tempo, os sobrenadantes foram colhidos e as citocinas foram dosadas através do Kit CBA. (A)- TNF. (B)- IL-6. (C)- MCP-1/ CCL-2. (D)- IL-10. (E)- Razão TNF/IL-10. * p< 0,05 **p< 0,01 (Teste t student).

3.4 Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos oriundos de camundongos tratados intramuscularmente com Glucantime

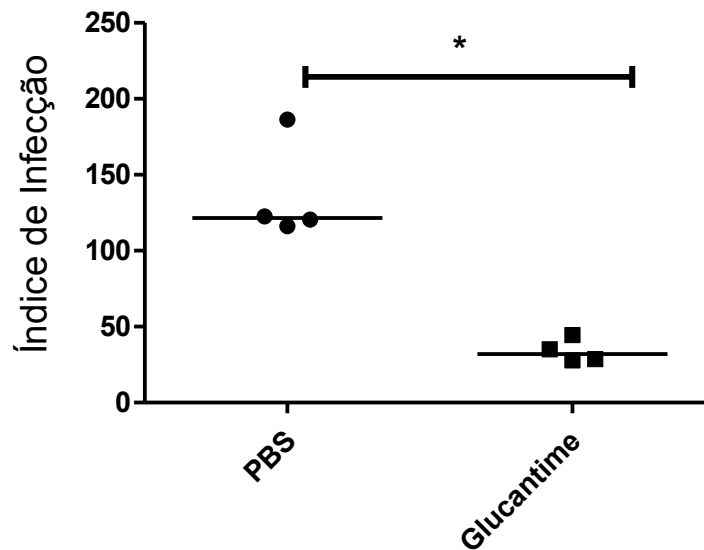
Ao final do tratamento dos animais, os macrófagos peritoneais foram retirados e as monocamadas foram infectadas com *L. braziliensis* ou *T. cruzi*. Os resultados mostraram que nos macrófagos dos animais tratados com Glucantime houve redução significativa do índice de infecção tanto com a *L. braziliensis* (Figura 19) quanto com o *T. cruzi* (Figura 20) quando comparados aos animais tratados com PBS.

Figura 19 - Efeito do tratamento intramuscular com Glucantime na atividade microbicida de macrófagos frente à infecção *in vitro* com *L. braziliensis*



Legenda: Camundongos Swiss sadios receberam tratamento intramuscular por 5 dias com Glucantime ou com PBS. Os macrófagos de cada animal individualmente foram aderidos e infectados com *L. braziliensis* (5 parasitos/macrófago). As células infectadas foram então incubadas 48 horas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C/5%CO₂. Após esse período, as monocamadas de macrófagos foram fixadas e coradas com Panótico e o índice de infecção calculado. Contagem de mínimo de 200 macrófagos por lamínula. * p<0.05 (Teste t de Student).

Figura 20 - Efeito do tratamento intramuscular com Glucantime na atividade microbicida de macrófagos frente à infecção *in vitro* com *T. cruzi*

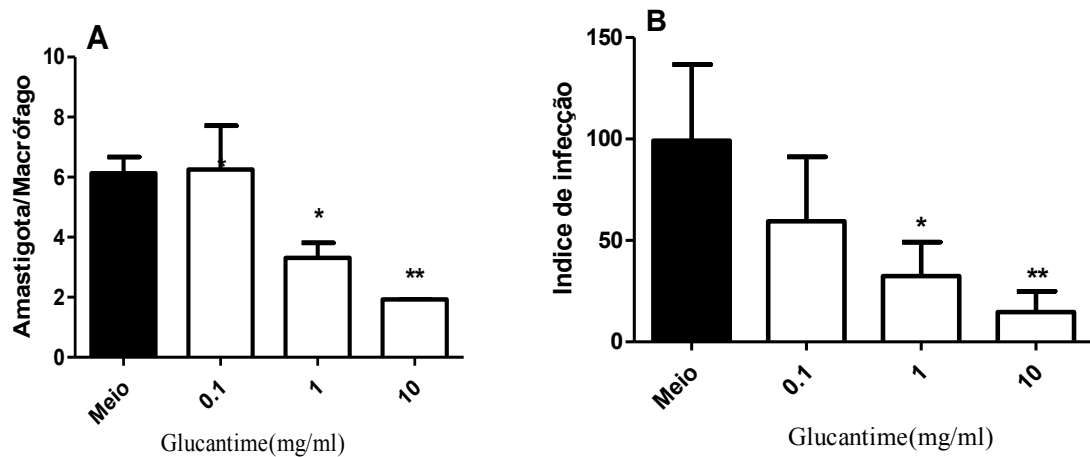


Legenda: Camundongos Swiss sadios receberam tratamento intramuscular por 5 dias com Glucantime ou com PBS. Os macrófagos de cada animal individualmente foram aderidos e infectados com *T.cruzi* (1 parasito/macrófago). As células infectadas foram então incubadas 48 horas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C/5%CO₂. Após esse período, as monocamadas de macrófagos foram fixadas e coradas com Panótico e o índice de infecção calculado. Contagem de mínimo de 200 macrófagos por lamínula. * p<0.05 (Teste t de Student).

3.5 Efeito do tratamento *in vitro* de macrófagos com Glucantime no índice de infecção do *T. cruzi*

Para avaliarmos se o efeito do tratamento de macrófagos com Glucantime antes da infecção seria capaz de modular a sua capacidade microbicida, as monocamadas foram pré-tratadas por 24 horas e posteriormente foram infectadas com *T.cruzi*. Os sobrenadantes foram guardados para avaliação da produção de NO. O resultado mostrou que o tratamento prévio dos macrófagos com Glucantime reduziu o número de amastigotas por macrófagos em 46% e 68,52% nas concentrações de 1 mg/ml e 10 mg/ml, respectivamente (Figura 21A). O índice de infecção também foi reduzido em 51% e 87%, nas concentrações de 1 mg/ml e 10 mg/ml, respectivamente (Figura 21B), quando comparadas com o controle que não foi exposto ao fármaco.

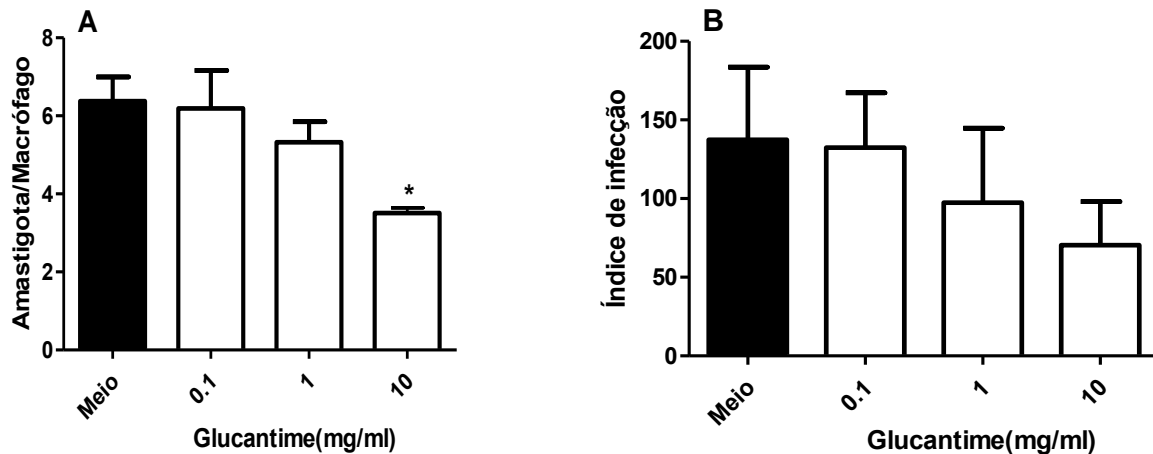
Figura 21 – Macrófagos tratados com Glucantime antes da infecção com *T. cruzi*.



Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram tratadas com as diferentes concentrações de Glucantime por 24h a 37°C/5%CO₂. As células foram lavadas com PBS e infectadas com *T. cruzi* (1 parasito/macrófago) por 16 horas. A monocamada de macrófagos foi lavada e incubada com meio de cultura RPMI com 10% soro fetal bovino por 48 horas. Após esse período, os macrófagos foram corados com Panótico e o número de amastigotas intracelulares foi contado por microscopia. (A) Contagem de amastigotas por macrófago, no mínimo de 200 macrófagos por lamínula (Gráfico representativo de quatro experimentos independentes). (B) Contagem de no mínimo 200 macrófagos por lamínulas e o resultado foi expresso como índice de infecção (IF). (Gráfico da média de quatro experimentos independentes) ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05. (Teste One-Way ANOVA).

Como não havia referências consistentes quanto à ação antiparasitária do Glucantime sobre o *T. cruzi* na literatura, avaliamos a atividade do fármaco sobre formas amastigotas do parasito. Para tal, as monocamadas de macrófagos foram submetidas a infecção pelo *T. cruzi* e o tratamento foi então realizado por 48 horas. A Figura 22 mostra que somente houve redução significativa do número de amastigotas intracelulares na concentração de 10mg/ml de Glucantime (Figura 22 A). Entretanto, o índice de infecção teve uma tendência de redução, mas sem significância estatística (n=4 experimentos independentes)(Figura 22 B).

Figura 22 - Tratamento dos macrófagos com Glucantime após a infecção com *T.cruzi*

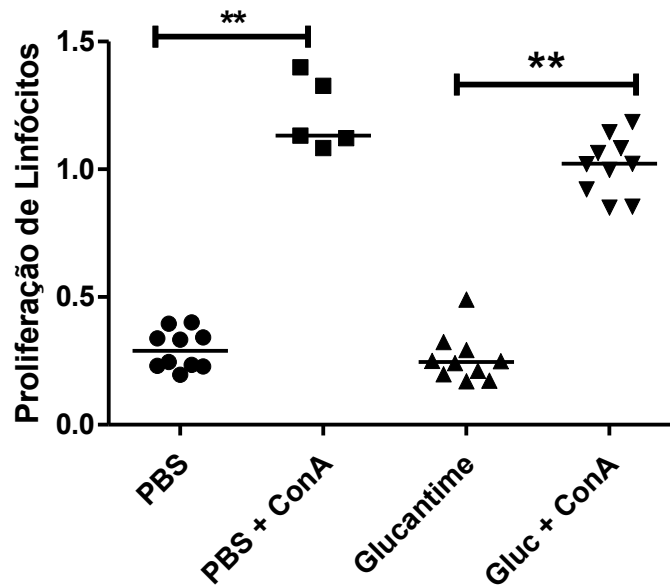


Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectadas com *T.cruzi* por 16 horas. Após esse tempo, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de Glucantime por 48h a 37°C/5%CO₂. Após esse período, os macrófagos foram corados com Panótico e o número de amastigotas intracelulares foi contado por microscopia. (A) Contagem de amastigotas por macrófago, no mínimo de 200 macrófagos por lamínula. (Gráfico representativo de três experimentos independentes) (B) Contagem de no mínimo 200 macrófagos por lamínula e o resultado foi expresso como índice de infecção (IF) (Gráfico representativo de três experimentos independentes)**p<0,01(Teste One-Way ANOVA).

3.6 Proliferação de linfócitos T

Para avaliarmos se o tratamento intramuscular com Glucantime influenciaria na capacidade proliferativa de linfócitos T, essas células foram obtidas do baço e estimuladas com o mitógeno Concanavalina A. O resultado mostrou que o tratamento com Glucantime não alterou a proliferação de linfócitos quando comparada com os animais tratados com PBS (Figura 23).

Figura 23- Proliferação de linfócitos T em animais tratados intramuscular com Glucantime

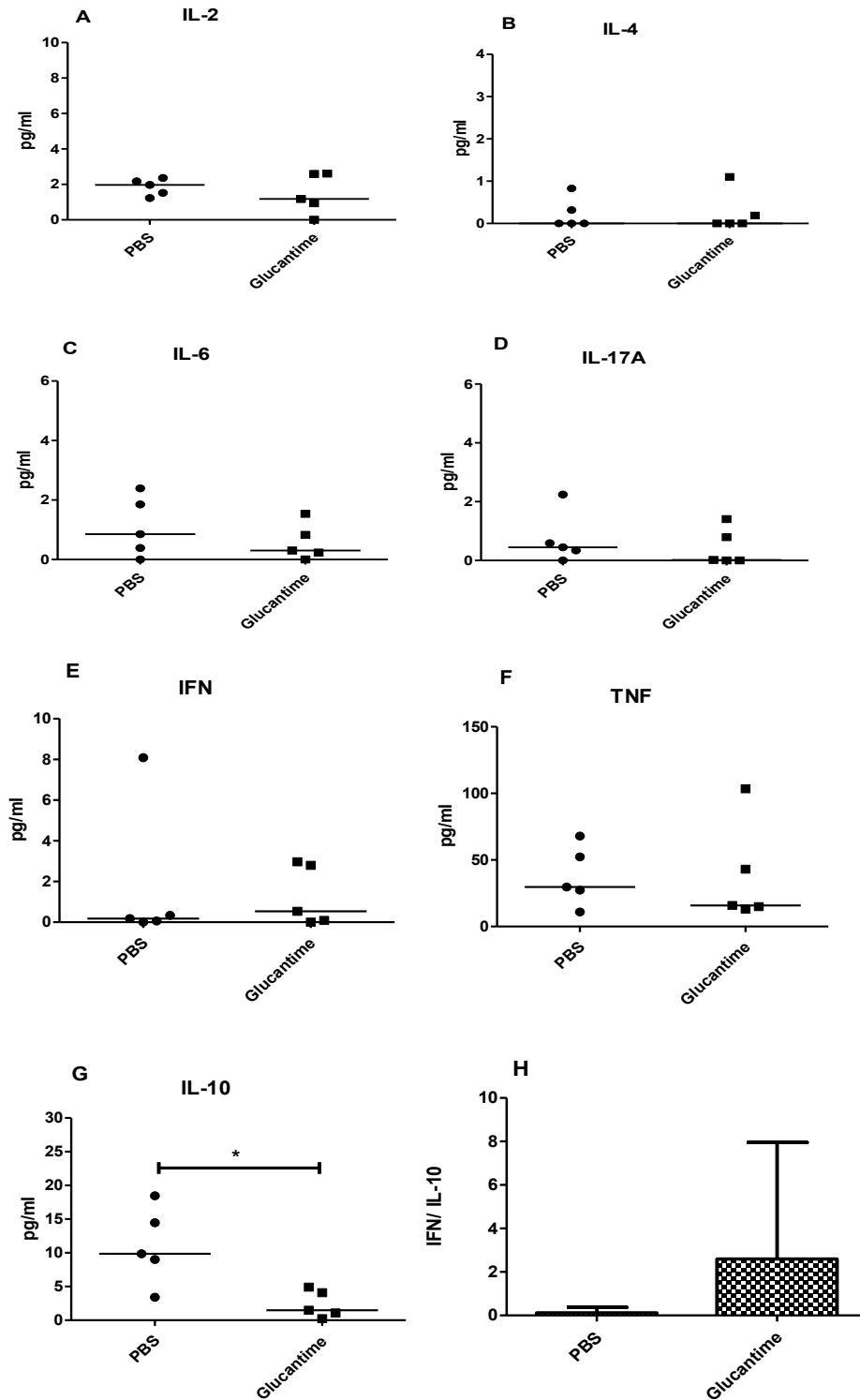


Legenda: As células foram obtidas por maceração do baço de cada animal que recebeu tratamento com Glucantime e PBS, foram contadas e ajustadas para 2×10^6 células por ml e foi adicionada o mitógeno Concanavalina A. As células foram incubadas por 72 horas a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. A análise da capacidade proliferativa foi mensurada pelo método do MTT. ** $p < 0,05$ (One Way Anova - teste não paramétrico, pós teste- Dunns).

3.7 Avaliação da produção de citocinas de linfócitos oriundos de camundongos tratados de forma intramuscular *in vivo* com Glucantime

Sabendo que o tratamento intramuscular de camundongos com o fármaco não alterava a capacidade proliferativa de linfócitos, fomos avaliar como essas células estavam respondendo ao estímulo mitogenico em relação à produção de suas citocinas. Os resultados mostraram que o tratamento com Glucantime diminuiu a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, comparado com o controle (Figura 24), mas sem alterar a produção das demais citocinas. A razão entre a produção de IFN e IL-10 teve tendência para perfil inflamatório, embora sem significância estatística (Figura 24H).

Figura 24 - Produção de citocinas de linfócitos de camundongos tratados intramuscular *in vivo* com Glucantime

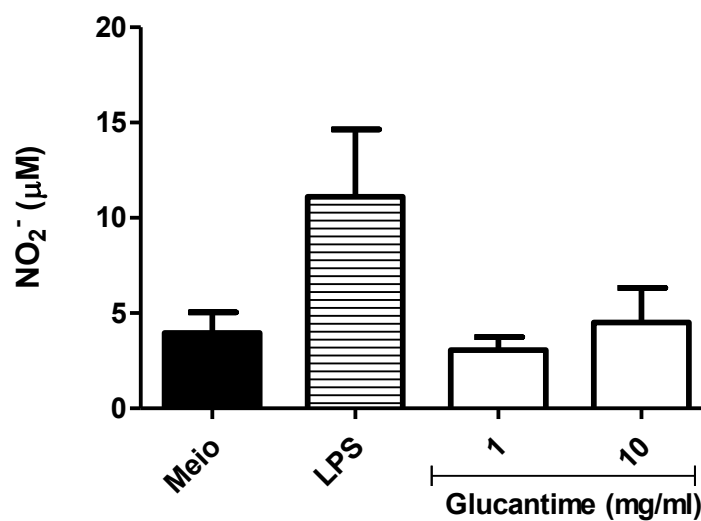


Legenda: Camundongos Swiss sadios receberam tratamento intramuscular com Glucantime (40mg/Kg) ou com PBS diariamente por 5 dias consecutivos. No sexto dia, os linfócitos de cada animal individualmente foram isolados do baço e incubados por 48h em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse tempo, as células foram submetidas a centrifugação por 10 minutos a 459G e os sobrenadantes foram colhidos e as citocinas foram dosadas através do Kit CBA e analisados por citometria. (A)- IL-2. (B)- IL-4. (C)- IL-6. (D)-IL-17A. (E)- IFN. (F)- TNF. (G)- IL-10. (H)- Razão IFN/IL-10.* $p < 0,05$ (Teste t Student).

3.8 Avaliação do efeito do Glucantime na produção de óxido nítrico pelos macrófagos

Para saber se o Glucantime induziria alguma alteração na produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos tratados *in vitro*, a dosagem de nitrito foi feita no sobrenadante das monocamadas após 24h de tratamento. Os resultados mostraram que o Glucantime não interferiu na produção de NO em nenhuma das concentrações testadas (Figura 25).

Figura 25 - Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados *in vitro* com Glucantime

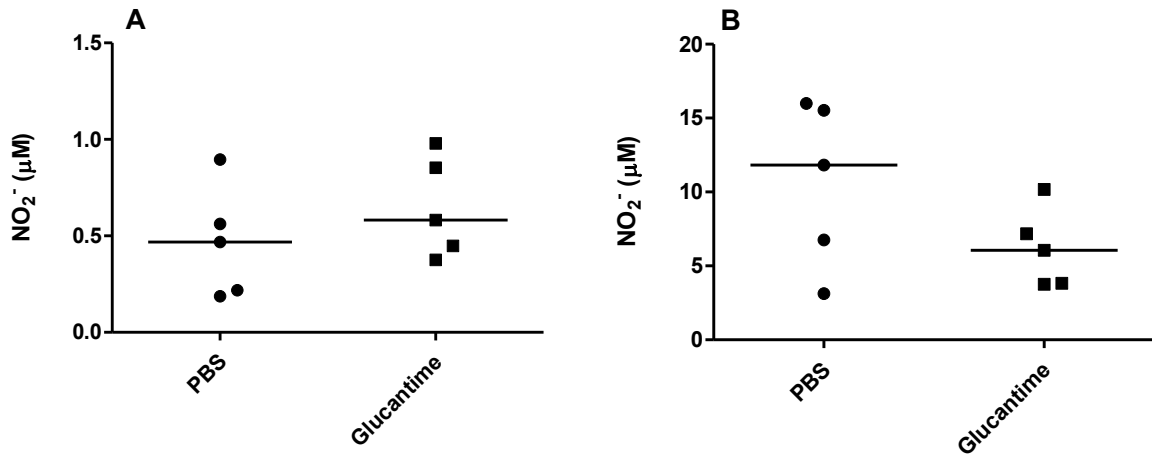


Legenda: Macrófagos peritoneais de camundongos foram aderidos e tratados *in vitro* com 5µg/ml de LPS ou tratados com Glucantime por 24 horas e o nitrito foi dosado nos sobrenadantes pelo método de Griess. Resultados expressos como significativo de três experimentos independentes.

3.9 Avaliação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos que foram tratados *in vivo* com Glucantime

Para avaliarmos se o tratamento intraperitoneal de camundongos com Glucantime induziria alteração na produção de NO pelos macrófagos, foi realizada a dosagem de nitrito nas monocamadas das células peritoneais. Os resultados demonstraram que os macrófagos de animais que receberam o tratamento com Glucantime pela via intraperitoneal não apresentaram diferenças significativas na produção de NO, quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 26 A). Nos macrófagos de animais que receberam Glucantime pela via intramuscular, a produção de nitrito foi relativamente menor que dos animais controle, mas sem diferença estatisticamente relevante (Figura 26 B).

Figura 26 - Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de camundongos tratados com o Glucantime intraperitoneal e intramuscular

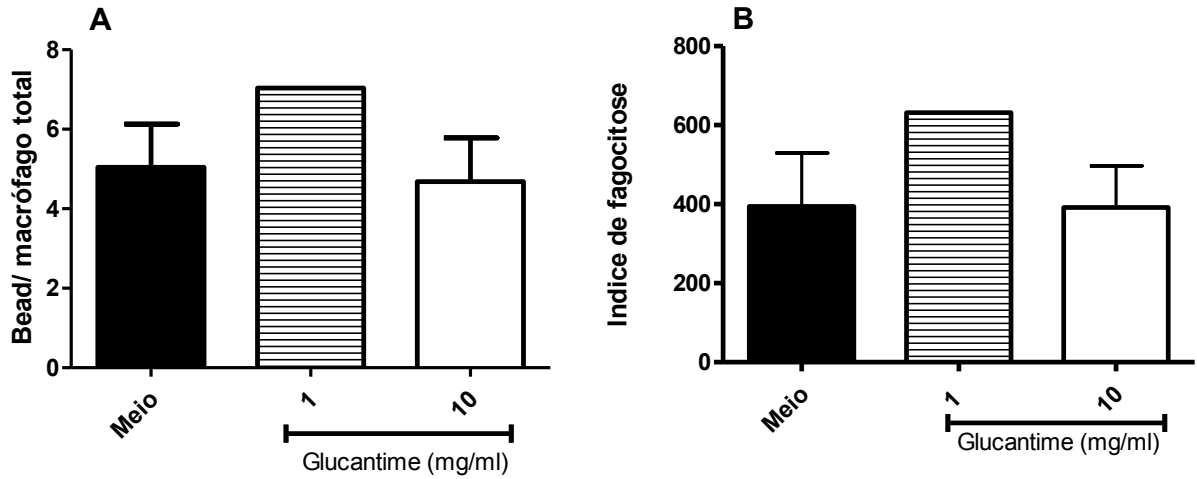


Legenda: Macrófagos peritoneais de camundongos tratados por via intraperitoneal ou intramuscular com PBS ou Glucantime durante 5 dias, foram aderidos e incubados *overnight* a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Após esse tempo, os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram colhidos e foi realizada a dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess. Cada ponto representa dados de um animal. (A)- tratamento intraperitoneal. (B)- tratamento intramuscular.

3.10 Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos

Para analisar se o Glucantime induziria a alguma alteração na capacidade fagocítica dos macrófagos, as monocamadas foram tratadas por 24 horas com Glucantime e depois incubadas com as “beads” fluorescentes. O resultado demonstrou que, nas condições testadas, não houve alteração no número de beads por macrófago e nem no índice fagocítico quando comparados com o controle sem tratamento (Figura 27A e B).

Figura 27- Análise da capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com Glucantime



Legenda: Macrófagos peritoneais de camundongos foram aderidos em câmaras Lab-Tek *overnight*. Após esse tempo foram tratados por 24 horas com as diferentes concentrações de Glucantime ou com RPMI suplementado com 10% de SFB e incubados em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, as monocamadas de macrófagos foram lavadas com PBS morno e as microesferas de látex fluorescentes (beads) foram plaqueadas em uma concentração de 3 beads por macrófago e deixadas durante 3 horas protegidos da luz, sob as mesmas condições. Depois do tempo de incubação, a lâmina foi preparada e levada para análise no microscópio de fluorescência. Resultados foram expressos em (A) beads por macrófagos e (B) Índice fagocítico. Média ±SD, representativo de quatro experimentos independentes.

4 DISCUSSÃO

O arsenal terapêutico contra as leishmanioses é restrito a alguns poucos fármacos e suas formulações. Os antimoniais pentavalentes, tais como o Glucantime, são geralmente usados como primeira escolha para a terapêutica, sendo esse o tratamento clássico para todas as manifestações clínicas da doença na maioria dos países, inclusive no Brasil. Embora sejam usados desde 1920, seu mecanismo não é bem conhecido e investigado. A ação microbicida dos antimoniais pentavalentes se dá principalmente após ser reduzido em antimônio trivalente (SbIII). Estudos mostram que o SbIII atua direto sobre as formas amastigotas interferindo no potencial redox, causando danos na cadeia respiratória e no DNA do parasito, também podendo induzir apoptose pelo aumento de Ca^{2+} intracelular e estresse oxidativo (Frézard F. *et al.*, 2009; Kip *et al.*, 2018). Também existem alguns estudos que apontam que o Glucantime atua indiretamente nas células do hospedeiro, levando a um aumento da capacidade fagocítica e da produção de TNF de monócitos (Muniz-Junqueira & Paula-Coelho, 2008; Saldanha *et al.*, 2012). Nesse sentido é importante um estudo exploratório da ação do Glucantime sobre o macrófago, que é a principal célula hospedeira e também a célula efetora final capaz de resolver a infecção.

Em um estudo anterior, demonstramos que macrófagos pré-tratados com Glucantime *in vitro* e em macrófagos oriundos de camundongos que receberam tratamento *in vivo* foram capazes de reduzir significativamente a infecção com *L. braziliensis* (Siqueira, 2014). Para compreender melhor este efeito, no presente trabalho propomos estudar o possível efeito modulador do Glucantime sobre a funcionalidade do macrófago. Quando avaliamos o efeito do tratamento *in vitro* com Glucantime na produção de citocinas pelos macrófagos, observamos um aumento em citocinas pro-inflamatórias, sobretudo TNF e IL-6. Por outro lado, observamos diminuição de MCP-1/ CCL-2, que é uma quimiocina que recruta células inflamatórias (Scott & Novais, 2016). Embora não tenhamos observado alterações nos níveis de IL-10, a razão TNF/IL-10 apontou claramente para um perfil inflamatório dos macrófagos tratados com Glucantime. A indução de TNF pelo tratamento *in vitro* com Glucantime já havia sido demonstrada em monócitos (Giudice *et al.*, 2007; Muniz-Junqueira & Paula-Coelho, 2008). Resultado semelhante foi observado em monócitos provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea após sete dias de tratamento com Glucantime (Saldanha *et al.*, 2012).

Após a infecção com *L. braziliensis*, esses macrófagos previamente tratados com Glucantime diminuíram, de modo geral, todas as citocinas inclusive a IL-10. A razão TNF/IL-10 só foi superior ao controle na maior concentração de Glucantime (10mg/mL). A redução de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos infectados é esperado. Parasitos intracelulares de macrófagos, tais como *Leishmania* spp., são capazes de modular várias funções da célula hospedeira, sobretudo as funções relacionadas ao processo inflamatório e a ação microbicida, para garantir sua sobrevivência (Bogdan & Rollinghoff, 1999; Podinovskai & Descoteaux, 2015). Por exemplo, macrófagos infectados com *Leishmania* spp, produzem menos citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12, TNF e IL-6 (Privé & Descoteaux, 2000; Lapara & Kelly, 2010; Shweash *et al.*, 2011).

Para avaliar se o tratamento de animais com Glucantime *in vivo* seria capaz também de modular o perfil de citocinas dos macrófagos peritoneais, tratamos camundongos com o fármaco pelas vias de administração intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM) por cinco dias consecutivos. Os macrófagos provenientes dos animais tratados via IP demonstraram um aumento significativo nos níveis de TNF, enquanto as demais citocinas dosadas (IL-6, MCP-1/CCL-2 e IL-10) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Embora sem diferença estatística significativa, a razão entre TNF/IL-10 apresentou tendência ao perfil pró-inflamatório dos macrófagos oriundos de animais tratados com Glucantime IP (Figura 17E). Esses resultados se mostraram semelhantes com os dados obtidos após o tratamento *in vitro* dos macrófagos em relação ao TNF e a razão TNF/IL-10 (Figura 15E).

Quando a mesma dose de Glucantime foi administrada por via intramuscular (IM) , os macrófagos peritoneais apresentaram uma diminuição significativa na produção de MCP-1/CCL-2 (Figura 18C) e de IL-10 (Figura 18D) e mantiveram os níveis das citocinas pró-inflamatórias como o TNF e a IL-6 semelhantes ao do grupo controle tratado com PBS. Porém, a razão TNF/IL-10 foi significativamente mais alta nos macrófagos de camundongos que receberam Glucantime IM (Figura 18E), sugerindo o perfil inflamatório.

O trabalho de Gosh e colaboradores (2013) avaliou o efeito do tratamento com dose única do antimonial pentavalente estibogluconato de sódio (Pentostam, 16 mg/Kg/peso) pela via intravenosa em camundongos BALB/c e observaram que os animais apresentaram níveis séricos aumentados de IL-2, IL-12 e TNF, sugerindo também a indução de um perfil pró-inflamatório.

Nosso estudo sobre a capacidade microbicida dos macrófagos pré-tratados *in vitro* com Glucantime mostrou que houve redução significativa e dose-dependente de amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Esse resultado foi similar ao que já havíamos demonstrado

anteriormente, usando *L. braziliensis* (Siqueira, 2014). Na literatura não existem dados consistentes acerca da atividade dos antimoniais pentavalentes sobre o *T. cruzi*. Sendo assim, decidimos realizar o teste de atividade sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, tratando os macrófagos após a infecção. Como resultado, verificamos que o Glucantime parece ter alguma ação inibitória sobre o parasito, sobretudo na dose mais alta usada em nossos ensaios (10mg/mL). Quando comparamos os macrófagos que foram tratados previamente antes da infecção com aqueles tratados após infecção, observamos uma redução muito maior na carga parasitária nos macrófagos pré-tratados. É possível que, assim como a *Leishmania*, o *T. cruzi* também seja mais sensível ao Sb III, que pode ter sido acumulado nos macrófagos pré-tratados.

É conhecido que o Glucantime atua como pró-fármaco e para exercer sua função leishmanicida o antimônio (Sb) precisa ser reduzido da sua forma pentavalente (SbV) para a sua forma trivalente (SbIII). Essa redução, segundo Frézard e colaboradores (2001), é feita pela ação da glutathione reduzida (GSH) nos fagolisossomos dos macrófagos. Ferreira e colaboradores (2003) demonstraram que a cisteína e cisteína-glicina, típicos presentes no lisossomo, também reduzem o Sb no macrófago dentro de compartimentos ácidos. Esse processo de redução do SbV para SbIII também pode ocorrer dentro das amastigotas de *Leishmania* pela ação da tripanotina, uma vez que as formas axênicas são susceptíveis ao antimônio pentavalente (Ephroset *al.*, 1999). Sendo assim, em nosso estudo o efeito microbicida observado após o pré-tratamento com o fármaco *in vitro* poderia estar relacionado à presença de SbIII dentro do macrófago.

Essa possibilidade do acúmulo direto do fármaco nas células peritoneais dos camundongos foi diminuída quando administramos o Glucantime pela via intramuscular durante 5 dias consecutivos. Os macrófagos peritoneais desses animais foram capazes de diminuir o índice de infecção frente tanto em relação à *L. braziliensis* (Figura 19), quanto em relação ao *T. cruzi* (Figura 20). É sabido que após a administração parenteral, pela via intramuscular, o Glucantime é rapidamente distribuído pelo organismo, sendo o fígado o local onde em 30 minutos o fármaco é retido e acumulado (Borborema *et al.*, 2013). Embora não seja possível descartarmos a possibilidade de acúmulo de SbIII nos macrófagos peritoneais, a modulação das citocinas pelo Glucantime para um perfil pró-inflamatório deve ter contribuído para o efeito antiparasitário observado.

Apesar dos macrófagos apresentarem um perfil pró-inflamatório induzido pelo Glucantime, a sua capacidade fagocítica não apresentou alterações significativas. Do mesmo modo, nas condições testadas, tanto o tratamento *in vitro* (Figura 25) como o tratamento *in*

vivo (Figura 26 e 27) com Glucantime, não observamos alterações na produção de NO pelos macrófagos. Seraslan e colaboradores (2005) demonstraram que indivíduos com LC ativa tem níveis significativamente aumentados de NO no soro, quando comparados com os pacientes com LC tratados intralesionalmente com antimoniato de meglumina e com indivíduos saudáveis. Esses dados podem sugerir que o Glucantime não atue no aumento da produção de NO pelos macrófagos. Muniz-Junqueira & Paula-Coelho (2008) mostraram que ocorre um aumento da produção do ânion superóxido e indiretamente de NO em monócitos de pessoas saudáveis submetidos ao tratamento com Glucantime. O estudo de Saldanha e colaboradores (2012), usando monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea tratados com Glucantime, mostrou que a produção de NO não era aumentada. Gosh e colaboradores (2013) trataram *in vitro* macrófagos peritoneais com estibogluconato de sódio e demonstraram aumento de NO e ROS, com associação com IFN- γ , sem o IFN- γ os níveis de NO foram basais.

Linfócitos Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , importante para ativação clássica de macrófagos (M1). Por outro lado, linfócitos Th2 produzem principalmente IL-4, IL-10 e IL-13, que induzem no macrófago um padrão alternativamente ativado (M2) (Scott & Novais, 2016). No presente trabalho avaliamos se o tratamento com Glucantime pela via IM seria capaz de influenciar no padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos T. Observamos que linfócitos isolados do baço dos animais tratados com Glucantime responderam normalmente ao estímulo mitogênico com ConA (Figura 23). Dentre as citocinas analisadas, observamos diminuição significativa na produção de IL-10 (Figura 24G) pelos linfócitos T de animais tratados com Glucantime em relação ao grupo controle. As demais citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, IFN- γ e TNF não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Figura 24). A Razão IFN- γ /IL-10 não apresentou diferença estatística entre os grupos, mas apresentou tendência para resposta do tipo 1 no grupo tratado com Glucantime. É possível que a significativa redução de IL-10, uma citocina anti-inflamatória que desativa macrófagos, contribua para uma ativação eficiente de macrófagos e o controle da infecção.

Embora ainda sejam necessários mais estudos para caracterizar o perfil fenotípico do macrófago, os resultados apresentados nesta tese demonstram que o antimonial pentavalente Glucantime é capaz de modular diretamente o macrófago para um estado pró-inflamatório. Este efeito sobre a célula hospedeira da *Leishmania* pode contribuir de modo importante para seu mecanismo de ação antiparasitário.

CONCLUSÕES

Macrófagos tratados *in vitro* e macrófagos oriundos de animais tratados *in vivo* pelas vias IP ou IM com Glucantime apresentaram um perfil de citocinas pró-inflamatório.

Os macrófagos oriundos de animais tratados com Glucantime apresentaram maior capacidade microbicida frente a infecção por *L.braziliensis* e *T. cruzi*, porém sem apresentar correlação com a produção de óxido nítrico.

O pré-tratamento de macrófagos *in vitro* com Glucantime reduziu o número de amastigotas intracelulares *T. cruzi* de modo dose-dependente. O tratamento dos macrófagos após a infecção com *T. cruzi* reduziu o número de amastigotas significativamente apenas com a concentração mais alta de 10mg/ml.

O tratamento com Glucantime não alterou a capacidade fagocítica dos macrófagos.

O tratamento de animais com Glucantime IM não alterou a capacidade proliferativa de linfócitos T, mas reduziu significativamente a produção de IL-10.

REFERÊNCIAS

- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016. DOI:10.1371/journal.pntd.0004349.
- Almeida, OLS, Santos, JB. Avanços No Tratamento Da Leishmaniose Tegumentar Do Novo Mundo Nos Últimos Dez Anos: Uma Revisão Sistemática da literatura. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2011; 86 (3): 497-506.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*. 2012; e3567.
- Arango Duque G & Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2014
doi:10.3389/fimmu.2014.00491.
- Arboleda M, Jaramillo L, Ortiz D. Leishmaniasis cutánea y herpes zoster multidermatómico. *Revista Chilena de Infectología*. 2013; 30(6): 680-682.
- Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patient with American Tegumentary Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007; 195: 1846-1851.
- Atri C, Guerfali FZ & Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
- Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose tegumentar nas Américas*. 1ª edição.- Salvador, Editora Gráfica, 2011.
- Barratt J, Kaufer A, Peters B, Craig D, Lawrence A, Roberts T, Lee R, Peters, Douglas Craig, Andrea Lawrence, Tamalee Roberts, Rogan Lee, McAuliffe G, Stark D e John Ellis. Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonias australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixerous Parasitism in the Leishmaniinae. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017
DOI:10.1371/journal.pntd.0005215.
- Bartholomeu DC, de Paiva RMC, Mendes TAO, DaRocha WD, Teixeira SMR. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. *PLOS Pathogens*. 2014. Volume 10(12). doi:10.1371/journal.ppat.1004399.
- Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. 2007; 37: 1097-1106.

- Bento DB, De Souza B, Steckert AV, Dias RO, Leffa DD, Moreno SE, Petronilho F. De Andrade VM, Dal-Pizzol F, Romão PR. Oxidative stress in mice treated with antileishmanial Meglumine Antimonate. *Research in Veterinary Science*. 2013;95: 1134-1141.
- Borborema SET, Osso Junior JA, Andrade Junior HF de e Nascimento N do. Biodistribution of meglumine antimoniate in healthy and *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi-infected BALB/c mice. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013. 108(5), 623–630. doi:10.1590/0074-0276108052013014.
- Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, WeyenberghJv, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and Interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. *BMC Infectious Diseases*. 2005; 113:1–9.
- Carvalho L, Luque-Ortega JR, López- Martín C, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. The 8-aminoquinoline analogue Sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55: 4204-4210.
- Castro JA, deMecca MM & Bartel LC. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*. 2006. 25(8), 471–479. doi:10.1191/0960327106het653oa.
- Chakraborty AK, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1988; 152: 605-611.
- Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 719361.
- Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D and Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2015. doi: 10.3389/fimmu.2015.00263.
- Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007. p. 3030–3032 Vol. 51, No. 8 0066-4804/07/\$08.000 doi:10.1128/AAC.00404-07.
- Conceição-Silva, F. e Alves, C.R. et al. *Leishmanioses do continente americano.*/organizado por Fátima Conceição-Silva e Carlos Roberto Alves.- Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.
- Costa ASA, Costa GC, Aquino DMCd, Mendonça VRRd, Barral A, Barral-Netto M, et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012; 107:735–9. [PubMed: 22990961].
- Chistiakov DA., Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Sobenin IA, Orekhov AN. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *International journal of cardiology*. 2015. 184:436-445.

Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshe YV. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology*. 2018. Volume 223, issue 1, pages 101-111.

Croft SL, Sundar S e Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*. 2006. doi:10.1128/CMR.19.1.111–126.

Cruz-Guilloty F, Saeed AM, Duffort S, Cano M, Ebrahimi KB, Ballmick A, Tan Y, Wang H, Laird JM, Salomon RG, Handa JT, Perez VL. T cells and macrophages responding to oxidative damage cooperate in pathogenesis of a mouse model of age-related macular degeneration. *Plos One*. 2014; 9: e88201.

Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. 2002; 72: 132-141.

Cupolillo E, Medina-Acosta H, Noyes H, Momen H, Grimaldi JR G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*. 2000; 16:142-144.

Da Rocha ICM, dos Santos LHM, Coura-Vital W, da Cunha GMR, Magalhães F do C, da Silva TAM, Franco Morais MH, Oliveira E, Reis IA. e Carneiro M. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. *Parasites & Vector*. 2018. 11(1).doi:10.1186/s13071-018-3166-0.

De Aguiar MG, Gonçalves JE, d'Auriol Souza M, de Silva RE, Silveira JN, Cota G. Plasma antimony determination during cutaneous leishmaniasis treatment with intralesional infiltration of meglumine antimoniate. *Tropical Medicine & International Health*. 2018. doi:10.1111/tmi.13130.

Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17: 1471-1477.

Dietze R, Cravalho SFG, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, Sanchez J, Schuster B, Groggl M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8- aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 65: 685-689.

Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Marangi M, Grande R, Armignacco O, Gradone L, Gramiccia M. Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. 2015 *PLoS ONE* 10(6): e0129418. doi:10.1371/journal.pone.0129418

DNDi. Doenças negligenciadas: panorama. 2012. Disponível em <http://www.dndi.org.br/doencas-negligenciadas.html>.

DNDi. Progress through partnership. Annual report, 2016.

Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH & de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012.67(11), 2576–2597. doi:10.1093/jac/dks275.

- Ephros M, Bitnumn A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43: 278-282.
- El-On J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *The Israel Medical Association Journal*. 2009; 11: 623-628.
- Faraut- Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugère B, Dumon H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimonite: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41: 827-830.
- Ferreira CS, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouelltte M, Frézard F. Thiol- induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with Trypanothione, Cysteinyl-Glycine, Cysteine and Glutathione. *Biometals: An International Journal on the role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine*. 2003; 16: 441-446.
- Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira- Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology*. 2012; 2: 11-19.
- Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MAP. Glutathione induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimonate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45: 913-916.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009; 14:2317–36.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, De Jesus AM, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonenses* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tumentar leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*. 2007; 7:7.
- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infectious Diseases*. 2012; 12: 75.
- Gollob K J, Viana A G., Dutra WO. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite Immunol*. 2014 August ; 36(8): 367–376. doi:10.1111/pim.12100.
- Gomes-Silva A, Bittar RC, Nogueira RS, Amato VS, Da Silva Mattos M, Oliveira- Neto MP, Coutinho SG, Da- Cruz AM. Can Interferon-Gamma and Interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and Experimental Immunology*. 2007; 149: 440-444.
- Gonçalves-Neto VS, Barros- Filho AKD, Dos Santos AM, De Sá Prazeres MPC, Bezerril ACR, Fonseca AVL, Rebêlo JMM. An analysis of the spatiotemporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in countries locted along road and railway corridors in the

State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013; 46: 322-328.

Ghorbai M., Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: Drugs or vaccine therapy? *Drug design, development and Therapy*. 2018.v.12,p. 25-40.

Ghosh M, Roy K e Roy S. Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. *Journal Antimicrob Chemotherapy*. 2013. 68:2834-8.

Goto H, Prianti M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2009; 51: 241-246.

Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signaling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*. 2005; 130: S27-35.

Hartley MA, Kohl K, Ronet C, Fasen N. The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19: 119-130.

Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira LS, Duarte MM, Vieira LQ. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*. 2012; 203818.

Jain K, Jain NK. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*. 2013; 18: 1272-1281.

Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R. Paramomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 2009; 164: 111-117.

Jones CV, Ricardo SD. Macrophages and CSF-1: implicatios for development and beyond. *Organogenesis*. 2013;9 (4): 249-60.

Jorge TCA. e Castro SL. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELOBooks .

Kip AE, Schellens JHM, Beijnen JH, & Dorlo TPC. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*. 2017. 57(2), 151–176. doi:10.1007/s40262-017-0570-0.

Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H e Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2005. 585(1-2), 71–78. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.012. Lapara NJ & Kelly BL. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *Journal of Inflammation*. 2010.7(1), 8. doi:10.1186/1476-9255-7-8.

Li C., Xu M.M., Wang K., Adler A.J., Vella A.T., Zhou B. Macrophage polarization and Metainflammation. *Translational Research* 2017. doi: 10.1016/j.trsl.2017.10.004.

Lima MI, Arruda VO, Alves EV, De Azevedo AP, Monteiro SG, Pereira SR. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. *Archives of Toxicology*. 2010; 84: 227-232.

Lindoso JAL. Lindosos AABP. Neglected Tropical Diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2009; 51: 247-253.

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imunes as infecções. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2004; 79: 647-667.

Mackey T.K, Liang B.A, Cuomo R., Hafen R., Brouwer K.C., Lee D.E. Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: a Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct; 27(4):949-79. doi: 10.1128/CMR.00045-14.

Marchese L, Nascimento J, Damasceno F, Bringaud F, Michels P & Silber A. The Uptake and Metabolism of Amino Acids and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids. *Pathogens*. 2018.7(2),36. doi:10.3390/pathogens7020036.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008. 13:453-461.

Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old world cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *Journal of Dermatological Cases reports*. 2013; 7: 31-41.

Ministério da Saúde manual de vigilância da leishmaniose tegumentar- brasil, 2017.189p.

MCgwire BS, Satoskar Ar. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. 2014; 107:7-14.

Menna-Barreto RFS. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death & Disease*. 2019. 10(2). doi:10.1038/s41419-019-1370-2.

Menon SS, Rossi R, Nshimyumukiza L, Zinszer K. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil a literature review. *Tropical Medicine and Health*. 2016; 44(9):10.1186/s41182-016-0011-z.

Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Fighting against leishmaniasis: Search of alkaloids as future true potential anti- leishmanial agents. *Mini reviews in Medical Chemistry*. 2009; 9:107-123.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2007.

Montalvo AM, Fraga J, Monzote L. Diagnóstico de leishmaniasis: de La observación microscópica Del parásito a La detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2012; 64:108-131.

Moghaddam AS, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S, Mardani F, Seifi B, Mohammad A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease: Macrophages in Health and Disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018. DOI 10.1002/jcp.26429.

Moreira VR, de Jesus LCL, Soares R-EP, Silva LDM, Pinto BAS, Melo MN, Paes AM, Pereira SRF. Meglumine antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017. 61(6).doi:10.1128/aac.02360-16.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*.1986. 136(7):2348–57.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *NIH Public Access*. 2009; 8: 958-969.

Mukherjee AK, Gupta G, Bhattacharjee S, Guha SK, Majunder S, Adhikari A, Bhattacharya P, Majumdar SB, Majumdar S. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. *The Journal of Infection*. 2010; 61: 173-184.

Muniz- Junqueira MI, Paula- Coelho VN. Melgumine Antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alfa it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *International Immunopharmacology*. 2008; 8: 1633-1638.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. *The Lancet*. 2005; 366: 1561-1577.

Neves DP, Melo PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. 11ª edição. São Paulo. Editora Atheneu. 2005;494:151-9.

Neto VA. Origino of the “Y strain” of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2010; 52(3):171, doi: 10.1590/S0036-46652010000300012.

(OPAS/OMS) Organização Panamericana da Saúde / Organização Mundial de Saúde – Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas; 2016 OPAS/OMS - www.paho.org/leishmaniasishttp://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=6721&Itemid=40754&lang=pt acessado dia 28/02/2016 as 19.

Ourives-Neves L, Talhari AN, Gadelha EPN, Da Silva Junior RM, Oliveira Guerra JA, Ferreira LCL, Talhari S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniate de Meglumina, Pentamidina e Anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2011;86: 1092-1101.

Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *Journal of Innate Immunity*. 2010;2: 204-215.

Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, Farronato G, Bruno A e Mortara L. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *Journal of Immunology Research*. 2018 1–25. doi:10.1155/2018/8917804

Penas F, Mirkin GA, Vera M, Cevey Á, González CD, Gómez MI, Sales ME, Goren NB. Treatment in vitro with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from *T. cruzi*-infected mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015.1852(5), 893–904.doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.019.

Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJF, Bertho ÁL, et al. *Leishmania braziliensis*-Reactive T Cells Are Down-Regulated in Long-Term Cured Cutaneous Leishmaniasis, but the Renewal Capacity of T Effector Memory Compartments Is Preserved. *PLoS ONE* 8(11): e81529. doi:10.1371/journal.pone.0081529; 2013.

Pérez-Molina J.A., Molina J. Chagas Disease *The lancet*. 2018. Volume 391.

Pham TTH, Loiseau PM, Barratt G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 454: 539-552.

Phillip Scott e Fernanda O. Novais. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature reviews immunology*. 2016. Volume 16 pag 581-592.

Pimentel MIF, Baptista C, Rubin EF, Ferreira E, Vasconcelos EC, Lyra MR, Salgueiro MM, Saheki MN, Rosalino CVM, Madeira MF, Da Silva AF, ConfortEM, Schubach AO. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimonite, but with good response to pentamidine: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44: 254-256.

Pinazo MJ, Munoz J, Posada E, Lopez-Chejade P, Gallego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(11):4896–9. [https:// doi.org/10.1128/AAC.00537-10](https://doi.org/10.1128/AAC.00537-10) PMID: 20823286.

Ponte CB, Alves EAR, Sampaio RNR, Urdapilleta AAA, Kuckelhaus CS, Muniz-Junqueira MI, Kuckelhauss AS. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *International Immunopharmacology*. 2012; 13: 114-119.

Privé C. e Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *European Journal of Immunology*. 2000. Aug; 30(8):2235-44.

Rais S, Perianin A, Lenoir M, Sadak A, Rivollet D, Paul M, Deniau M. Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44: 2406-2410.

Ramalho DB, Silva RE, da Senna MCR, de Moreira HSA, Pedras MJ, de Avelar D M, Saraiva L, Rabello A, Cota G. Meglumine antimoniate intralesional infiltration for localised cutaneous leishmaniasis: a single arm, open label, phase II clinical trial. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018. 113(9). doi:10.1590/0074-02760180200.

Reithinger R.; DujardinJ., LouzirH.,;Pirmez C., Alexander B., Brooker S., Washington G., Leopold P., Bailey M.S., Lockwood D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. 2007. v.7,p.581-596.

Reveiz L, Maia- Elkhoury ANS, Nicholls RS, Romero GAS, Yadon ZA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PlosOne*. 2013; 8: e61843.

Rey L. Bases da parasitologia médica / Luís Rey. – 3.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Oullette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human Leishmania (Viannia) Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006; 193: 1375-1383.

Saberi S, Arjmand R, Soleimanifard S, Khamesipour A, Hosseini SM, Salehi M, Varshosaz J, Palizban AA, Hejazi SH. In vivo/In vitro immune responses to L. major isolates from patients with no clinical response to Glucantime. *Advanced Biomedical Research*. 2016. 5:126.

Saldanha RR, Martins- Papa MC, Sampaio RNR, Muniz- Junqueira MI. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012; 106: 596-603.

Serarslan G, Yılmaz HR e Soğuş S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2005. 30, 267–271 doi: 10.1111/j.1365-2230.2005.01758.

Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaili S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Tavakol Afshari J. , Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018.233(9), 6425–6440. doi:10.1002/jcp.26429.

Shayan M, Padmanabhan J, Morris AH, Cheung B, Smith R, Schroers J, Kyriakides TR. Nanopatterned Bulk Metallic Glass-based Biomaterials Modulate Macrophage Polarization. *Acta Biomaterialia*. 2018. Doi 10.1016/j.actbio.2018.05.051.

Shi X, & Shiao SL. The role of macrophage phenotype in regulating the response to radiation therapy. *Translational Research*. 2018.191, 64–80. doi:10.1016/j.trsl.2017.11.002.

Shweash M, Adrienne McGachy H, Schroeder J, Neamatallah T, Bryant CE, Millington O, Mottram JC, Alexander J, Plevin R. Leishmania Mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Molecular Immunology*. 2010. 48(15-16), 1800–1808. doi:10.1016/j.molimm.2011.05.013.

Singh M., Jamal F, Dubey AK, Shivam P, Kumari S, Pushpanjali, Bordoloi C, S. Narayana VNR. Dasa, K. Pandeya, P. Dasa, Shubhankar K. Singh. Visceral leishmaniasis: A novel nuclear envelope protein “nucleoporins-93 (NUP-93)” from Leishmania donovani prompts macrophage signaling for T-cell activation towards host protective immune response. *Cytokine*. 2018. doi:10.1016/j.cyto.2018.07.005.

Siqueira. Ação do fármaco Glucantime sobre macrófagos de camundongos. 2014.

Sperandio da Silva GM, Mediano MF, Alvarenga Americano do Brasil PE, da Costa Chambela M, da Silva JA, de Sousa AS, et al. A clinical adverse drug reaction prediction model for patients with chagas disease treated with benznidazole. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2014; 58(11):6371–7. Doi 10.1128/AAC.02842-14 PMID: 25114135.

Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, Cacopardo B, Nunnari G. Mucosal Leishmaniasis: an underestimated presentation of a Neglected Disease. *BioMed Research International*. 2013.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, Mckerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118: 1301-1310.

TDR (Programa especial de investigação e capacitação no domínio das doenças tropicais). 2010; Disponível em www.who.int/tdr.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, De Souza W. Atlas didático. Ciclo de vida da Leishmania. 2013. 1ª Edição- Rio de Janeiro. Cecierj.

Thalhofer JC, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania (Infantum) chagasi*. *Infection and Immunity*. 2011; 79: 108-117.

Tiuman TS, Santos AO, Nakamura TU, Filho Dias BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011; 15: 525-532.

Uttinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, HatzCF. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly*. 2012 Nov 22;142:w13727. doi: 10.4414/smw.2012.13727.

Valverde Ricardo. <https://agencia.fiocruz.br/doencas-negligenciadas>

Vélez I, López L, Sánchez X, Mestra L, Rojas C, Rodríguez E. Efficacy of Miltefosine for the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010; 83: 351-356.

Vieira ÉLM, Keesen TSL, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunology*. 2013; 35: 65-72.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009. 7(2):157– 63. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157> PMID: 19254164.

Votýpka J, d'Avila-Levy C.M, Grellier P, Maslov D.A, Lukeš J, Yurchenko V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*. 2015, Vol. 31, No. 10.

Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martins S, Saha B. Miltefosine promotes IFN-gamma dominated anti-leishmanial immune response. *Journal of Immunology*. 2009; 182: 7146-7154.

WHO. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series #949. 2010.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf.

WHO, "Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases." Second WHO report on neglected tropical diseases. 2013.

WHO, Weekly epidemiological record global leishmaniasis update, 2006-2015: turning point in leishmaniasis surveillance, 2017.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 39925-39932.

Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M., Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *Journal of immunology*. 2012.189(7):3508-3520.