

BRUNO GENEROSO FARIA

Avaliação da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis*: incorporação de um novo parâmetro ao ensaio pré-clínico funcional multiparamétrico baseado em citometria de fluxo

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

2016

BRUNO GENEROSO FARIA

Avaliação da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis*: incorporação de um novo parâmetro ao ensaio pré-clínico funcional multiparamétrico baseado em citometria de fluxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia), do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes

Co-orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

2016

043 Faria, Bruno Generoso.

Avaliação da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. BRAZILIENSIS*: incorporação de um novo parâmetro ao ensaio pré-clínico funcional multiparamétrico baseado em citometria de fluxo [manuscrito] / Bruno Generoso Faria. - 2016.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes. Co-orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Farmacologia - Teses. 2. Descoberta de drogas. 3. CITOMETRIA DE FLUXO. 4. Ciência - Metodologia. 5. Inovação. I. Fagundes, Elaine Maria de Souza. II. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615.2

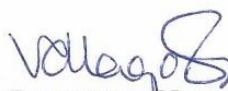
**"AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS
INTRACELULARES EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DO
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO INFECTADOS COM *L.
BRAZILIENSIS*: VALIDAÇÃO DE UM NOVO ENSAIO PRÉ-
CLÍNICO FUNCIONAL MULTIPARAMÉTRICO BASEADO EM
CITOMETRIA DE FLUXO"**

BRUNO GENEROSO FARIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **25 de maio de 2016**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



DR.ª. VANESSA PERUHYPE MAGALHÃES PASCOAL
CPQRR/FIOCRUZ



PROF. DR. RODOLFO CORDEIRO GIUNCHETTI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR



PROFA. DR.ª. ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 25 de maio de 2016

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LBIC – UFMG

Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LBCM – UFMG

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM – CPqRR

ORIENTAÇÃO

Orientador (a): Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes (LBCM – UFMG)

Co-orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (LBIC – UFMG)

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Laboratório de Biologia das Interações Celulares - LBIC

Dr^a. Walderez Ornelas Dutra

Ms. Maurício Azevedo Batista

Ms. Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior

Ms. Marina Luiza Rodrigues Alves

Laboratório de Biofísica de Nanosistemas Lipídicos

Dr. Frédéric Jean Georges Frezard

Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM

Dr^a. Andréa Teixeira Carvalho

Dr^a. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

AGÊNCIAS E INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

“Quem me dera ao menos uma vez, que o mais simples fosse visto como o mais importante. Mas nos deram espelhos e vimos um mundo doente” (Legião Urbana – Índios)

Dedicatória

À memória de minha saudosa avó, Maria das Dores Brandão Generoso.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realização do mestrado e pela concessão de bolsa de estudos, respectivamente.

A Professora Elaine Maria de Souza Fagundes, pela orientação, oportunidades e principalmente pela paciência.

Ao Professor Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pela também orientação, recepção em seu laboratório e grande colaboração na elaboração deste trabalho.

A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) e Biologia das Interações Celulares (LABIC) pelos momentos compartilhados. Em especial, agradeço a Otoni Melo Júnior, Maurício Azevedo Batista e Marina Luiza Rodrigues, que se tornaram muito mais do que companheiros de laboratório, e aos quais não poderia ter saído do lugar sem seus imprescindíveis auxílios.

A todos os amigos de Lavras, Obra Jovem de Santanna, Caio Gregório Team – Brazilian Jiu-Jitsu (CGT) e todos os demais, aos quais não citarei nomes para não ser injusto se me esquecer de alguém. Agradeço a presença de todos vocês em minha vida!

Aos Professores Guilherme Jordão de Magalhães Rosa e Bruno Dourado Valente, da UW-Madison (USA), por me ensinarem as mais importantes lições quanto a ciência que pude ter e que, sem dúvida alguma, influenciaram muito em minha vida desde então.

Por fim, e em especial, agradeço a toda minha família, base de minha vida e formação. A meus pais Angelo e Fátima, que mesmo com todas as dificuldades por nós encontradas, sempre se esforçaram em me mostrar o caminho da verdade e da justiça. Por serem o exemplo e a razão pela qual luto. A minha irmã Renata, companheira de todas as horas e que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas.

Acima de tudo, agradeço a Deus pela presença sempre marcante em minha vida. Por possibilitar aos meus olhos enxergar onde a visão normalmente não alcança e, principalmente, por me dar toda a coragem e força para me manter sempre firme nas importantes decisões que sempre tomei.

“Bem aventurados os que tem fome e sede de Justiça, porque serão saciados!” (Mt 5, 3-12).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses	18
1.2 Resposta imune a Leishmaniose Cutânea.....	21
1.3 Abordagem terapêutica das leishmanioses	24
1.4 Processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos	26
1.5 Prospecção de potenciais antiparasitários através de ensaios biológicos	27
1.6 Avaliação da citotoxicidade e da produção de citocinas intracelulares <i>in vitro</i> em ensaios com cultura de sangue total	29
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Aspectos éticos	34
4.2 Caracterização da população avaliada.....	34
4.3 Critérios de exclusão	34
4.4 Obtenção e marcação de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	34
4.5 Determinação das condições do ensaio proposto	36
4.6 Avaliação da atividade citotóxica do Glucantime® e da Anfotericina B em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com <i>L. braziliensis</i> : marcação com 7-amino actinomicina (7-AAD).....	36
4.7 Avaliação da atividade leishmanicida e produção de citocinas intracelulares em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Glucantime® e Anfotericina B	37
4.8 Análise dos dados	39
- Estratégias de análise de citotoxicidade, interação monócito e neutrófilo- <i>Leishmania</i> e produção de citocinas intracelulares em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano.....	39
4.9 Análise morfológica do perfil de interação de <i>L. braziliensis</i> com monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano por microscopia de luz e de fluorescência	40
4.10 Análise estatística dos dados	41
5. RESULTADOS.....	42

5.1 Avaliação da atividade citotóxica do Glucantime® e da Anfotericina B em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com <i>L. braziliensis</i> : marcação com 7-amino actinomicina (7-AAD).....	42
5.2 Avaliação da atividade leishmanicida e produção de citocinas intracelulares em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Glucantime® e Anfotericina B	42
5.2.1 Avaliação da interação Monócito- <i>Leishmania</i> e Neutrófilo- <i>Leishmania</i> (atividade leishmanicida)..	42
5.2.2 Avaliação da produção de citocinas intracelulares em Monócitos.....	43
5.2.3 Avaliação da produção de citocinas intracelulares em Neutrófilos.....	44
5.3 Análise morfológica do perfil de interação de <i>L. braziliensis</i> com monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano por microscopia óptica de luz e de fluorescência	45
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de marcadores de superfície celular bem como para a produção de citocinas intracelulares.	39
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês *new drug application*). Representando de azul a fase (i) - pré-clínica ou pesquisa básica e em alaranjado, a fase (ii) – clínica. (Fonte: Guido & Oliva, 2010)...... 27
- Figura 2** - Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. A Figura “A” representa o perfil de promastigotas de *L. braziliensis*, selecionadas no gate “Promastigotas” em gráfico de distribuição pontual de tamanho *versus* granulidade. A Figura “B” representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com Alexa Fluor 647 em gráfico de histograma..... 35
- Figura 3** - Análise representativa da interação monócito-*Leishmania* e neutrófilo-*Leishmania* por citometria de fluxo. A Figura “A” representa o perfil da população de monócitos e neutrófilos, selecionados nos gates “Monócitos” e “Neutrófilos” em gráfico de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulidade (SSC). A Figura “B” representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com Alexa Fluor 647, em gráfico de densidade de fluorescência Leish Alexa Fluor 647 *versus* fluorescência CD14-FITC. A Figura “C” representa o perfil de análise da população de neutrófilos na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com Alexa Fluor 647, em gráfico de densidade de fluorescência Leish Alexa Fluor 647 *versus* granulidade. Monócitos e Neutrófilos que interagiram com o parasito estão representados no quadrante duplo positivo (Q2). 39
- Figura 4** - Análise da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico através de citometria de fluxo. A Figura “A” representa o perfil da população de monócitos e neutrófilos, selecionados no gate “Monócitos” e “Neutrófilos”, em gráfico de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulidade (SSC). A Figura “B” representa perfil de análise da produção de IL-10 por monócitos do sangue periférico por percentual em gráfico de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* densidade de fluorescência IL-10PE. A Figura “C” representa perfil de análise da produção de IL-10 por neutrófilos do sangue periférico por percentual em gráfico de densidade de granulidade (SSC) *versus* densidade de fluorescência IL-10PE. Monócitos e neutrófilos produtores de IL-10 estão representados no quadrante duplo-positivo (Q2)..... 40
- Figura 5** - Avaliação do efeito do Glucantime® e Anfotericina na viabilidade de monócitos (A) e neutrófilos (B) do sangue periférico de indivíduos dos grupos: Controle de Células, que corresponde às células na presença de meio de cultura (CC, n = 10), Glucantime®, que corresponde à células na presença de Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 10) e Anfotericina B, que corresponde às células na presença de Anfotericina B a 25 µg/mL (Anfotericina B, n = 10). Os resultados estão apresentados como percentual médio e desvio padrão de células 7-AAD⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras..... 42

- Figura 6** - Avaliação do efeito do Glucantime® e Anfotericina na interação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* com monócitos (A) e neutrófilos (B) do sangue periférico de indivíduos dos grupos: Não Tratado, que corresponde às células na presença do parasito e solvente (NT, n = 17), Glucantime®, que corresponde à célula na presença do parasito e Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 17) e Anfotericina B, que corresponde a mesma condição anterior, na presença de Anfotericina B 25 µg/mL (Anfotericina B, n = 17). Os resultados estão apresentados como valores médios e desvio padrão do percentual de células CD14⁺Leish⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras. 43
- Figura 7** - Avaliação da produção de citocinas intracelulares IL-10 (A), TNF-α (B) e IL-12 (C) em monócitos CD14⁺ do sangue periférico cultivado na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish⁺), na presença ou não dos fármacos, sendo: Controle (CC, n = 17), Não Tratada (NT, n = 17), Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 17), e Anfotericina B a 25 µg/mL (Anfotericina B, n = 17). Os resultados estão apresentados como percentual médio e desvio padrão de monócitos CD14⁺CITOCINAS⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CC, NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras. 44
- Figura 8** - Avaliação da produção de citocinas intracelulares IL-10 (A), TNF-α (B) e IL-12 (C) em neutrófilos do sangue periférico cultivados na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish⁺), tratadas ou não com os fármacos, sendo: Controle (CC, n = 17), Não Tratado (NT, n = 17), Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 17), e Anfotericina B a 25 µg/mL (Anfotericina B, n = 17). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão do percentual de neutrófilos-CITOCINAS⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos CC, NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras. 45
- Figura 9** Fotomicrografias de leucócitos do sangue periférico humano contendo ou não formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis* internalizadas. Em A e B, através da microscopia de luz e utilizando a coloração de May-Grunwald-Giemsa, visualiza-se células polimorfonucleares sem a presença de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis*. Em C e D podemos já visulizar as formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis* internalizadas, sendo indicadas pelas setas pretas. Barras equivalentes a: A, B, C e D, 11µm. 46
- Figura 10** Fotomicrografias de leucócitos do sangue periférico humano contendo ou não formas amastigotas de *L. braziliensis*. Em A e B, utilizando a técnica de microscopia de fluorescência e utilizando o fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), observa-se a marcação de núcleos de células polimorfonucleares sem a presença de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis*. Já em C e D, observa-se a marcação de núcleos de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis*, indicado pelas setas brancas. Em E, visualiza-se a representação em 3D utilizando microscopia de fluorescência, marcadas com DAPI, apresentando o núcleo de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis* indicados pelas setas brancas. Barras equivalentes a: A, B, C e D 8µm; E não possui valores. 47

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
AG	Aminoguanidina
ATP	Adenosina Trifosfato
BFA	Brefeldina A
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Dióxido de Carbono
CpqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CRL	Centro de Referência em Leishmanioses
CS	Controle Saudável
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-Diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolofluoresceína
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPR	Ressonância Eletrônica Paramagnética
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescência
FSC	Tamanho Celular
GTP	Guanosina Trifosfato
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
IDRM	Intradermo Reação de Montenegro
IFN-γ	Interferon Gama
IFN-γR	Receptor de IFN-γ
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IMF	Intensidade Média de Fluorescência

iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LC	Leishmaniose Cutânea
LC T0	Pacientes com LCL avaliados antes do tratamento
LC T90	Pacientes com LCL avaliados 90 dias após o tratamento
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
Leish	Estímulo com formas promastigotas vivas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
LIT	Liver infusion triptose
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
M	Molar
MFF	Solução Fixadora
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS 1x	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2
PBS-W	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2 com 0,5% albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica
PBS-P	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,2 com 0,5% albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e saponina

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila piridinina
pH	Potencial hidrogênico
PPRs	Receptores de reconhecimento padrão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sb ⁺⁵	Antimonial pentavalente
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Granulosidade celular
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

RESUMO

Assim como as demais doenças negligenciadas, as opções terapêuticas relacionadas ao tratamento das leishmanioses são ainda consideradas insuficientes, possuindo problemas como baixa eficácia, alta toxicidade e emergência de cepas resistentes. Este cenário é ainda agravado quando consideramos o número limitado de programas com foco nas áreas de inovação e descoberta de fármacos para doenças negligenciadas. Neste contexto, maiores esforços são necessários para a descoberta e desenvolvimento de novos potenciais protótipos com atividade leishmanicida, os quais são avaliados por ensaios biológicos baseados em células. Em 2012, nosso grupo descreveu a padronização de um novo ensaio funcional multiparamétrico por citometria de fluxo que permitiu avaliar simultaneamente a atividade leishmanicida e citotóxica (imunotóxica) de dois fármacos utilizados na clínica, o Glucantime® e a Anfotericina B. O método compreende o ensaio de internalização de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* marcadas com fluorocromo, por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano e análise simultânea de imunotoxicidade (avaliação de apoptose e necrose) por citometria de fluxo. No presente trabalho, validamos este ensaio funcional multiparamétrico, sendo utilizados os fármacos Anfotericina B e Glucantime®, em culturas de sangue periférico humano ($n=17$ doadores saudáveis) na presença ou não de promastigotas vivas de *L. braziliensis*. Neste sentido, foram avaliados nas populações de monócitos e neutrófilos o possível efeito citotóxico, a interação entre estes fagócitos e *L. braziliensis*, além dos níveis de citocinas intracelulares (IL-10, TNF- α e IL-12). Os resultados demonstraram que houve significativa redução da porcentagem de interação entre monócitos e neutrófilos com o parasito na presença dos tratamentos (Glucantime® e Anfotericina B) em comparação com o grupo não tratado. A análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas demonstrou aumento de IL-10, IL-12 e TNF- α nas culturas tratadas com Glucantime® e Anfotericina B na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, em relação as culturas controles. Estes resultados indicam que o novo ensaio funcional provou ser extremamente útil como um método confirmatório para a seleção de substâncias promissoras com atividade anti-*Leishmania*, permitindo o acesso a diferentes parâmetros importantes no contexto da descoberta de fármacos. Esta inovação metodológica é considerada também mais complexa, por apresentar maior sensibilidade em função de sua natureza multiparamétrica e funcional, permitindo, de forma quantitativa, a seleção de compostos para estudos subsequentes nos diferentes estágios da descoberta de fármacos, auxiliando também estudos *in vivo*, visando a redução da utilização de animais nestas fases.

Palavras-chave: Inovação metodológica, citometria de fluxo, descoberta de fármacos.

ABSTRACT

Therapeutic options for neglected diseases for leishmaniasis's treatment are still insufficiently and has a problems as a low efficacy, high toxicity and a rise of resistant strains. Associated with this, the reality of the existence of few programs focused in drug discovery for neglected diseases is actually increasing this scenario. In this context, a new and more studies are necessary to discover and develop new potentials compounds with a leishmanicidal activity. In 2012, our group described a standardization of new more complex assay using flow cytometry that enables the access of cytotoxicity and leishmanicidal activity of two drugs that are commonly used in clinical approaches (Glucantime® and Amphotericin B). The new methodology is done through the quantification of internalization rate of labeled-*L. braziliensis* for monocytes and neutrophils from the human peripheral blood with a simultaneously assessment of cytotoxicity (late apoptosis or necrosis) by flow cytometry. At this study we validated this multiparametric assay when we used Glucantime® and Amphotericin B in human whole blood cultures ($n=17$ health donors) at the presence or not of live promastigote forms of *L. braziliensis*. Following this sense, the populations of monocytes and neutrophils were evaluated about the cytotoxic effect, interaction between this phagocytes and *L. braziliensis* and levels of intracellular cytokines (IL-10, TNF- α and IL-12). The results showed that had a significantly reduction in a quantification of the interaction of the phagocytes with the parasite in cultures with treatment with the two drugs (Glucantime® and Amphotericin B) when we compared with the non-treated cultures. The analysis of the intracellular cytokines profile showed an increase of IL-10, IL-12 and TNF- α at the treated cultures with Glucantime® and Amphotericin B in the presence of live promastigote forms of *L. braziliensis*, enabling the access of different important parameters at drug discovery context. This methodologic innovation is also considered more complex because shows more sensibility as a function of your multiparametric and functional characteristics enabling as a quantitative form, the selection of compounds for new subsequent studies at the different steps of drug discovery programs and can be useful to help *in vivo* studies in order to reduce the animals used at this phases.

Keywords: Methodologic Innovation, flow cytometry, drug discovery.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são relacionadas a um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Os parasitos são transmitidos pela picada de insetos fêmea pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, e gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. O gênero *Leishmania* compreende parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro de células fagocíticas mononucleares de mamíferos susceptíveis (Laison *et al.*, 1987). A diversidade de espécies de *Leishmania*, associada ao status e capacidade da resposta imune de cada indivíduo à infecção, relaciona-se com as várias apresentações clínicas da doença. Em função do caráter multifacetado das manifestações clínicas, diferentes classificações para a doença já foram propostas (Pearson & Sousa 1996, Grevelink & Lerner 1996). Entretanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) divide e caracteriza as leishmanioses em dois grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).

As leishmanioses estão entre as dez endemias mundiais de prioridade absoluta da OMS devido ao caráter endêmico em 98 países de diversas regiões do mundo, concentradas em áreas tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Europa (David & Craft, 2009; Ameen, 2010; WHO, 2014). O número de indivíduos infectados está estimado em aproximadamente 12 milhões, além disso, cerca de 367 milhões encontram-se em áreas tidas como de risco para a doença (WHO, 2014).

As leishmanioses, assim como outras doenças parasitárias endêmicas, têm sido relacionadas a áreas de pobreza e escassos recursos humanos e econômicos para seu controle e profilaxia. Porém, para cada local e foco, existem particularidades que devem ser avaliadas, para assim se estabelecer medidas profiláticas efetivas.

Dentre os espectros de manifestações das leishmanioses, destacam-se a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A classificação em Leishmaniose Tegumentar, foi proposta por Marzochi & Marzochi (1994), considerando a resposta do hospedeiro, a partir do local da picada do vetor, bem como a localização das lesões e a evolução clínica do paciente. Assim, a LT foi dividida em duas formas clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A leishmaniose cutânea compreende as formas:

cutânea localizada (única / múltipla), cutânea disseminada, recidiva cútis e cutânea difusa. A leishmaniose mucosa por sua vez compreende as formas: mucosa tardia, mucosa concomitante, mucosa contígua, mucosa primária e mucosa indeterminada (MS, 2007). Segundo a OMS, a incidência anual estimada para LT é de 700.000 a 1.2 milhões de casos (WHO, 2014). No Brasil, verificou-se no período de 1985 a 2012, uma média anual de 25.426 casos autóctones de LT, sendo 9.141 no ano 2012 (MS, 2013).

No estado de Minas Gerais, desde a década de 1950, época dos primeiros relatos da doença, os surtos registrados de LT vem sendo relacionados, quase exclusivamente, às atividades de desmatamento (Gontijo *et al.*, 2002). Entretanto, a partir da década de 1990, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações, sendo descritos casos em áreas periurbanas de cidades de médio e grande porte (Passos *et al.*, 1993; Kawa *et al.*, 2010; Shimabukuro *et al.*, 2010; Bacha *et al.*, 2011; Camara Coelho *et al.*, 2011; Quaresma, 2014), além das áreas de colonização antiga, levando à sua associação com reservatórios urbanos. Minas Gerais apresenta atualmente um dos maiores números de casos de LT dentre os estados brasileiros, onde foram notificados nos anos de 2008 a 2012 – 1.160, 1.047, 1.926, 1.746, 1.041 casos da doença, respectivamente (SES-MG, 2013). A LC é amplamente distribuída, e cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões epidemiológicas: as Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia Ocidental do Oriente Médio à Ásia Central. Os dez países com o maior número de casos confirmados são o Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam de 70 a 75% da incidência de LC em todo o mundo (WHO, 2014).

As leishmanioses podem ser causadas por qualquer espécie de *Leishmania*, e seu período de incubação varia de 15 dias a 8 semanas. Inicialmente forma-se um nódulo cutâneo único ou múltiplo no local da inoculação, que evolui para a úlcera, geralmente pouco dolorosa. O tamanho da lesão também é variável, podendo alcançar apenas alguns milímetros ou até mesmo mais de 10 centímetros. Além das lesões cutâneas clássicas podem ocorrer casos assintomáticos que são confirmados durante inquéritos epidemiológicos com indivíduos que possuem Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva, mas que não apresentam cicatrizes nem história de lesões. Existem ainda, relatos de formas subclínicas que evoluem para cura espontânea dentro de 6 a 15 meses, aproximadamente (David & Craft, 2009).

No Brasil, foram identificados sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas como agentes etiológicos da LC: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Grimaldi *et al.*, 1989; Silveira *et al.*, 2002). A espécie *L. braziliensis* está presente em todo o território, e é a

principal responsável pela leishmaniose cutânea localizada (LCL) (MS, 2007), forma clínica mais comum. A LCL consiste inicialmente de pápula ou nódulo caracterizado por infiltrado dérmico rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos, que com a evolução da lesão, torna-se ulcerada, redonda ou ovalada, com bordas bem definidas, elevadas e endurecidas (Magalhães *et al.*, 1986; Gutierrez *et al.*, 1991; Weigle *et al.*, 1996). Difere-se da forma cutânea disseminada e da forma cutânea difusa, formas clínicas menos frequentes, e que caracterizam espectros mais graves. A carga parasitária nas lesões varia de acordo com a espécie de *Leishmania* infectante e com o estado imunológico do hospedeiro.

A *Leishmania braziliensis* é um protozoário que leva à ocorrência de lesões cutâneas e mucosas metastáticas, se distribuindo amplamente no Brasil, tanto em áreas de colonização recente na Amazônia quanto em antigas do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MS, 2006). Alguns autores fornecem papel de destaque à *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) como o vetor mais importante no Brasil. Na região sudeste, a transmissão da *L. braziliensis* está associada principalmente aos vetores *Lutzomyia (N.) whitmani* e *Lutzomyia (N.) intermedia*. Em Minas Gerais, tem sido demonstrado a ocorrência de um maior número de casos de LC transmitidos por *L. (N.) whitmani*. Essa espécie já foi encontrada em um grande número de áreas endêmicas e em associação com uma ampla diversidade vegetacional (Quaresma, 2014). *L. (N.) whitmani* também tem sido descrito como de ocorrência em peridomicílios, sistemas extensivos de criação de suínos bem como em plantações de banana, o que demonstra a habilidade de sobrevivência desta espécie em ambiente doméstico (Quaresma, 2014). A relativa falta de conhecimentos específicos sobre a ecologia dos vetores é um fator limitante da possibilidade de estabelecimento de novas medidas que possam vir a ser mais eficazes, além da elaboração de modelos preditivos que possam fornecer informações sobre as áreas e períodos de maior risco de transmissão.

A *Leishmania* spp. é um parasito digenético (heteroxeno), que estabelece seu ciclo entre os hospedeiros vertebrados e seus vetores sob as formas amastigotas (ovais e sem flagelo aparente) e dentro das células do sistema mononuclear fagocitário dos mamíferos, além de várias formas flageladas no tubo digestivo dos flebotomíneos (promastigotas procíclicas e metacíclicas) (Pinto-da-Silva *et al.*, 2002). A forma infectante de *L. braziliensis*, assim como nas outras espécies de *Leishmania*, é a promastigota metacíclica, que é transmitida ao hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo realizado pelo inseto vetor. Primeiramente o flebótomo ingere o sangue contendo as formas amastigotas e estas, ao alcançarem o intestino médio do vetor, sofrem um primeiro ciclo de replicação e se transformam em formas promastigotas procíclicas flageladas. As formas promastigotas, também por processos

sucessivos de divisão binária, se multiplicam ainda no sangue ingerido devido ao fato deste possuir um envolto de membrana peritrófica, que é secretada pelas células do intestino médio do inseto (Sack, 1989; Muskus & Marín Villa, 2002). Após a digestão do sangue, a membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas ficam livres, passando a colonizar a região do piloro e ílio, onde permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal, por meio de hemidesmossomos, com o auxílio do lipofosfoglicano (LPG). Nesta fase, os parasitos sofrem sucessivas divisões celulares até atingir a fase metacíclica (término do ciclo replicativo), onde ocorrem mudanças estruturais nas moléculas de LPG ancoradas na membrana extracelular do parasito. Os parasitos do gênero *Leishmania* mudam o tamanho ou adicionam ramificações ao LPG, diminuindo a sua afinidade pelo intestino do vetor, conseguindo assim deixar o intestino e migrar em direção à probóscide do inseto, onde permanecem até o próximo repasto sanguíneo, reiniciando assim o ciclo (Kavoosi *et al.*, 2006; Kavoosi *et al.*, 2010). A partir da deposição das formas promastigotas metacíclicas na pele (homem - hospedeiro acidental), inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro, crucial no estabelecimento/controlado da infecção (MS, 2006).

1.2 Resposta imune a Leishmaniose Cutânea

Os monócitos e os neutrófilos podem ser considerados duas das principais células da resposta imune inata, podendo interiorizar e destruir patógenos. Especificamente, após diferenciação dos monócitos para macrófagos. Os macrófagos são células que realizam um importante papel no contexto das leishmanioses, tanto para a destruição do parasito e consequente eliminação da infecção, dependendo do perfil de resposta por parte dos linfócitos T (Giudice *et al.*, 2012). Essas células possuem um papel intrigante na leishmaniose, pois servem tanto como células hospedeiras para os parasitos, como células com habilidade de matar/controlar o crescimento destes microrganismos (Awasthi *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

A interação inicial *Leishmania*-macrófago é fundamental para o estabelecimento da infecção no hospedeiro nos casos de LT. Após o repasto do flebotomíneo e deposição na pele do hospedeiro, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. se ligam a receptores específicos presentes nestas células e são fagocitadas por macrófagos residentes (histiócitos), e também por células polimorfonucleares, como os neutrófilos, que correspondem às primeiras células a migrarem para o local da infecção (Mosser & Rosenthal, 1993). As formas

promastigotas internalizadas não se multiplicam no interior dos neutrófilo, levando-nos a crer que essas células são uma espécie de abrigo temporário para o parasito no momento inicial da infecção. As células infectadas, secretam então quimiocinas que atraem macrófagos para o sítio da infecção através de quimiotaxia. Alguns macrófagos podem fagocitar neutrófilos apoptóticos infectados, sendo que, desta ação, resulta a infecção destes macrófagos pelo parasito, culminando com a liberação de citocinas moduladoras como IL-10 e TGF- β (Zandbergen, 2004). Os parasitos internalizados irão indiretamente se estabelecer e se multiplicar dentro dos fagolisossomos dos macrófagos. Nos casos de LT, normalmente, esta proliferação ocorre na derme em intensidade dependente de fatores tanto do parasito quanto do hospedeiro. Em pacientes imunossuprimidos, a proliferação pode ser intensa, tornando possível a visualização de parasitos no tecido conjuntivo da derme em quantidade suficientemente alta, além de células parasitadas na epiderme (MS, 2006).

Com a infecção em curso, em um cenário onde a esta poderia ser controlada, a atividade leishmanicida de monócitos e macrófagos ocorreria em diferentes momentos. No início, a fagocitose das formas promastigotas pelos macrófagos resultaria em ativação de mecanismos oxidativos, com produção de radicais hidroxila, superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO), que interagiriam com a membrana fosfolipídica do patógeno levando-o a morte (Cunningham, 2002; Awasthi, 2004; Wilson, 2005). Posteriormente, os macrófagos quiescentes (parasitados com a forma amastigota) seriam ativados por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , para então a partir daí eliminar o parasito intracelularmente. A grande produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é o mecanismo mais eficiente utilizado por fagócitos e pode levar a danos em macromoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos ou carboidratos. Porém, estes efeitos podem também ser deletérios pois afetam também a função celular ocasionando o dano tecidual característico das lesões na LT (Vouldoukis, 1995).

Por outro lado, assim como outras espécies de parasitos, os protozoários do gênero *Leishmania* possuem diversos mecanismos de escape da resposta imunológica do hospedeiro, pois possuem o objetivo de se estabelecer no organismo. De acordo com De Souza-Leao *et al.* (1995) e Belkaid, Butcher & Sacks (1998), os parasitos possuem a capacidade de inibir determinadas funções exercidas pelos monócitos e macrófagos, como a fagocitose, produção de óxido nítrico e interleucina (IL)-12, bem como a expressão de HLA-DR. Desta forma, conseguem estabelecer a infecção.

Na literatura, já foi amplamente descrito que o estabelecimento e a evolução das lesões causadas por infecções por *L. brazilienses* são dependentes da imunidade celular (Pirmez *et al.*, 1990; Da-Cruz *et al.*, 1994; Coutinho *et al.*, 1998; Baratta-Masini *et al.*, 2007; Keesen *et al.*,

2011; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012; Freitas-Teixeira *et al.*, 2012). Porém, o perfil de resposta imune associado à infecção em humanos ainda não está bem determinado. A maioria dos estudos têm se concentrado na determinação de aspectos importantes da resposta imune na LCL, dentre eles os mecanismos imunológicos associados à resistência natural, bem como a presença de lesão ativa e os processos de cura espontânea, além da cura após o tratamento.

Os estudos realizados por Follador *et al.* (2002), no qual foi avaliada a resposta imune celular associada à resistência natural a leishmaniose em indivíduos assintomáticos, sem histórico prévio da doença e sem lesão aparente mostraram que pacientes considerados resistentes apresentavam níveis de IFN- γ e TNF- α mais baixos e níveis de IL-5 mais elevados no sobrenadante de cultura de linfócitos, quando comparados à pacientes com lesão ativa. Estes autores então sugeriram que o perfil misto de citocinas poderia modular a resposta imunológica, diminuindo a reação inflamatória e consequentemente o surgimento da lesão. Posteriormente, Baratta-Masini *et al.*, (2007) demonstraram que indivíduos considerados resistentes apresentavam um perfil de citocinas do tipo 0 (IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ) em níveis de produção basal. Contudo, no mesmo estudo, estes indivíduos apresentavam menor frequência de células T IL-4⁺, elevada razão entre células IFN- γ ⁺/IL10⁺ e altos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato em análises realizadas em culturas de células mononucleares do sangue periférico e estimuladas com antígeno de *Leishmania*, sugerindo assim maior proporção de citocinas do tipo 1 em relação às do tipo 2. Este perfil de resposta imune seria então ideal para contribuir para prevenção do crescimento dos parasitos e o desenvolvimento de lesões.

Estudos já demonstraram que ocorre um aumento da produção de IL-4 e IL-10 durante a fase inicial da infecção, sugerindo que essas citocinas estejam associadas à uma regulação da resposta do tipo 1, auxiliando assim a proliferação do parasito (Coutinho *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 1999; Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012). Entretanto, tem sido descrito que, ao se observar a evolução da lesão, os linfócitos T de pacientes portadores de LCL são capazes de produzir citocinas do tipo 1 (como IFN- γ e TNF- α). Assim, a LCL encontra-se relacionada à resposta imunológica que favorece a cura (Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). Desta forma, acredita-se que uma resposta predominantemente inflamatória (tipo 1) responsável pela eliminação do parasito, mas modulada, seja importante para a resolução da infecção na LCL, evitando lesões teciduais extensas. Nesse sentido, tem sido demonstrada também a presença de células T reguladoras, caracterizadas fenotipicamente como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, em lesões de pacientes portadores de LCL. Estas células são produtoras

de grandes quantidades de IL-10 e TGF- β e, Campanelli *et al.* (2006) observaram que em cultura, estas células podem ser capazes de inibir a proliferação de células T do sangue periférico, sugerindo ação imunorreguladora. O mesmo raciocínio foi proposto nos estudos realizados por Silveira *et al.*, (2005), Guimarães *et al.*, (2009) e Gollob *et al.*, (2015), em que relatam o fato de baixos níveis de TNF- α IFN- γ estarem associado à disseminação do parasito, indicando uma fraca resposta mediada por células T.

De acordo com alguns autores (Da-Cruz *et al.* 1994; Castellano *et al.* 2009; Reis *et al.* 2009; Brelaz *et al.*, 2012; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012), na cura clínica de pacientes, após tratamento específico, é observado um perfil de produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK que são ativadoras de macrófagos. Estas células produzem TNF- α que, em sinergia com o IFN- γ , induzem ativação de iNOS e produção de NO em larga escala, sendo o responsável pela destruição das formas amastigotas e eliminação do parasito (Giudice *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012).

1.3 Abordagem terapêutica das leishmanioses

Os antimoniais pentavalentes (Sb⁺⁵) são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (MS, 2007). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que interferem no metabolismo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP e GTP (Berman, 1988; MS, 2007). A exposição das formas amastigotas por quatro horas, nas doses de 150 a 500 mg de Sb⁺⁵/mL, resultaram em um decréscimo de certos substratos, dose dependente de CO₂. Quando expostos a 500 mg de Sb⁺⁵/mL, observou-se queda no nível de produção de CO₂ a partir da glicólise, facilitando a destruição do parasito. Os compostos de antimônio pentavalentes, como o estibogluconato de sódio, exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas que crescem em culturas de tecidos. Este acentuado contraste entre as atividades *in vitro* e *in vivo* do composto, sugere que, para exercer a atividade leishmanicida, é necessária a redução de Sb⁺⁵ para Sb⁺³. Outros mecanismos também podem estar envolvidos (MS, 2007).

Segundo a OMS (2012), para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose, a dose de antimonial recomendada varia entre 10 e 20 mg Sb⁺⁵/kg/dia, durante 20 dias seguidos, por via injetável intra-muscular ou endovenosa. Os dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados são o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de

sódio, este último não comercializado no Brasil (MS, 2007). O Glucantime® é indicado para o tratamento de todas as formas clínicas da LT, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. A principal limitação do Glucantime® é a sua toxicidade, que produz efeitos adversos potencialmente graves e fatais (Sampaio *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005) e impede seu emprego em pacientes com doenças pré-existentes, além de exigir monitoramento cuidadoso de diversas funções orgânicas (Herwaldt & Bermam, 1992). Seus principais efeitos tóxicos são arritmias cardíacas, disfunções renal, hepática e pancreática (Sampaio *et al.*, 1997; Oliveira-Neto *et al.*, 2000; MS, 2007).

A eficácia do Glucantime® na forma cutânea é variável dependendo da região estudada e do esquema de tratamento empregado. O prazo máximo estipulado pelo Ministério da Saúde para reepitelização completa das lesões é de noventa dias, mas os pacientes são acompanhados até doze meses após o término do tratamento para monitoração. Caso não ocorra cicatrização completa após três meses do término do tratamento, o esquema terapêutico é repetido, porém prolongado, com duração de 30 dias. Pacientes que não respondem ao tratamento convencional são tratados com drogas de segunda escolha, como Anfotericina B ou Pentamidina. A Anfotericina B é um antibiótico, utilizado no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos e apresenta atividade contra parasitos do gênero *Leishmania*. Acredita-se que assim como nos fungos, a Anfotericina B atue ligando-se ao ergosterol da membrana celular do parasito o que explica sua eficácia no tratamento (Singh, 2004; Sivakumar, 2004; Sudar *et al.*, 2004). Outras formulações da Anfotericina B, especialmente a lipossomal são consideradas ativas e apresentam menor toxicidade. Ela é melhor tolerada que a Anfotericina B convencional (Hiemenz, 1996; Singh, 2004; Sivakumar, 2004; Sudar *et al.*, 2004), agindo especialmente sobre células alvo (macrófagos). O fármaco é incorporado ao meio intracelular e, assim, reduz os efeitos colaterais com maior eficácia terapêutica, inclusive em pacientes sem resposta terapêutica ao antimonial. Seu uso é limitado, pelo alto custo e administração endovenosa, sendo, as doses de 1 a 4 mg/Kg, administradas em dias seguidos ou alternados (decisão conforme a apresentação clínica) durante 14 a 20 dias, segundo a OMS. Apresentam efeitos adversos como febre, dor de cabeça e nefrotoxicidade (Brycenson, 1987; Sampaio, 1989; Davidson, 1991; Torres-Cisneros, 1993; Hashim, 1995; Brendle *et al.*, 2002). Como se observa as opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses são insuficientes e apresentam uma série de problemas como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (Guido & Oliva, 2010). Esse cenário é agravado pelo número limitado e pela falta de inovação nos programas de desenvolvimento de novos fármacos (P&D) na área de doenças

negligenciadas (Nwaka & Hudson, 2006; Nwaka et al., 2008). Dessa forma, é essencial a concentração de esforços globais (governo – academia – indústria) para a criação e manutenção de programas de P&D, descoberta de novas alternativas terapêuticas e controle para tratamento de tais doenças (Guido & Oliva, 2010).

Diante da diversidade biológica existente, os extratos de plantas e os fungos endofíticos surgem como novas alternativas para o descobrimento de novos protótipos com atividade antiparasitária, mas esta abordagem ainda é insipiente. Eles representam uma fonte abundante de novos metabólitos bioativos e de diversidade química com grande potencial para exploração em diversas áreas como agricultura, medicina e indústria (Strobel & Daisy, 2003). Certamente a descoberta de novas substâncias é vantajosa, sendo uma área estimulante e promissora (Strobel & Daisy, 2003), principalmente quando consideramos as escassas opções terapêuticas apresentadas para o tratamento de doenças negligenciadas em geral. Há de salientar que a cura das leishmanioses, bem como a de diversas outras doenças negligenciadas, é apenas clínica, uma vez que os parasitos permanecem, em baixa concentração, no corpo do indivíduo por toda a vida (MS, 2007). Desta forma, a necessidade da descoberta de novas opções terapêuticas mais potentes torna-se altamente justificada.

1.4 Processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, sendo um processo diretamente ligado às inovações científicas e tecnológicas (Guido & Oliva, 2010). Os avanços expressivos nos ramos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos envolvidos nas diferentes doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando assim melhorias significativas na qualidade e expectativa de vida da população mundial (Guido & Oliva, 2010).

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (Guido & Oliva, 2010).

Este processo é dividido em duas grandes fases: (i) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (ii) desenvolvimento (ou clínica) (Lombardino & Lowe, 2004), como mostra a Figura 1. Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) com potencial de desenvolvimento clínico.

Neste contexto, a descoberta de drogas nos últimos 30 anos tem sido possível por meio da introdução de bioensaios *in vitro* de pequena escala, capazes de avaliar muitas amostras em tempo curto e, assim, fornecer resultados de testes em replicatas suficientes que possibilitem análise estatística consistente. Esse processo é conhecido como *screening* (ou triagem) para atividade biológica e os sistemas de ensaios usados são de importância fundamental para o sucesso do programa de bioprospecção (Bolzani, 2004).

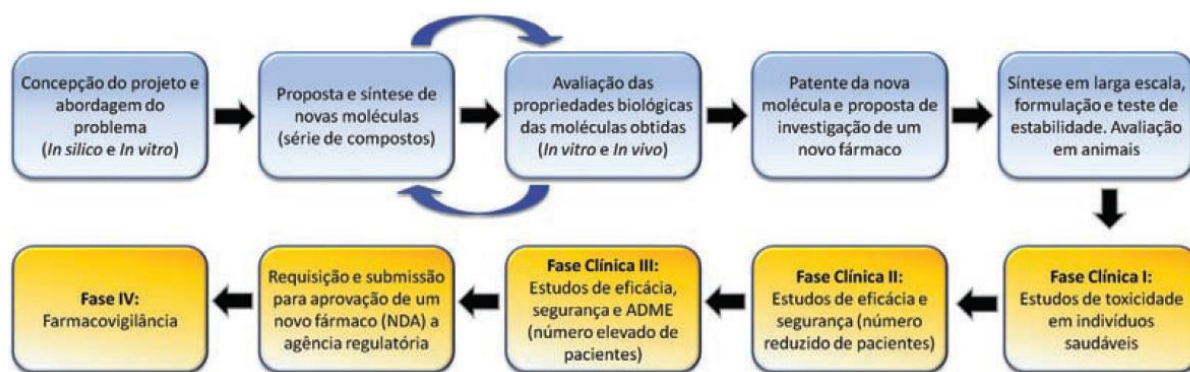


Figura 1 Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês *new drug application*). Representando de azul a fase (i) - pré-clínica ou pesquisa básica e em alaranjado, a fase (ii) – clínica. (Fonte: Guido & Oliva, 2010).

1.5 Prospeção de potenciais antiparasitários através de ensaios biológicos

Os ensaios baseados em cultivo celular ainda são considerados ferramentas promissoras para a pesquisa de triagens visando à descoberta de novos fármacos antiparasitários, antitumorais e imunomoduladores. O uso destes ensaios, que mimetizam especificamente o ambiente *in vivo*, pode levar a predição de maior acurácia no processo. Os ensaios utilizados para a triagem de drogas com atividade citotóxica para protozoários do gênero *Leishmania*, compreendem diferentes processos incluindo a utilização do parasito íntegro (forma livre ou intracelular) ou enzimas específicas de seu metabolismo, como alvo celular. Este último é baseado na utilização do ensaio bioquímico *in vitro* da enzima-alvo tripanotiona reductase (TR),

uma flavoenzima oxireductase, NADH dependente responsável pela proteção do *Trypanosoma cruzi* contra a ação de radicais livres. A TR ocorre exclusivamente em tripanosomatídeos que não possuem a glutathione reductase (hGR) a enzima equivalente em humanos que atua contra o estresse oxidativo. Muitos autores têm indicado a TR como um dos mais promissores alvos na pesquisa de drogas tripanosomicidas e leishmanicidas. A presença dela unicamente em tripanosomatídeos e a sua ausência em células do hospedeiro mamífero, fazem desta enzima um atrativo alvo para o desenvolvimento também de novos agentes quimioterápicos (Aguirre et al., 2004; Mukul et al., 2005).

Os métodos que utilizam o parasito na sua forma livre ou intracelular podem ser realizados em placas multipoços. A avaliação qualitativa e quantitativa dos processos pode ser realizada por métodos colorimétricos seguidos por determinação em espectrofotômetro ou no citômetro de fluxo (Rolón et al., 2006, Bodley et al, 1995).

Entre os métodos utilizando-se os parasitos livres, o método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é o mais utilizado para a triagem de substâncias sintéticas e produtos naturais com atividade antiparasitária/leishmanicida, sendo considerado um método rápido e preciso. Esse ensaio é baseado no substrato MTT, que é convertido em uma substância cromógena intermediária, o formazan, pela ação da dehidrogenase mitocondrial do parasito (Berg *et al.*,1994). Conforme Muelas-Serrano *et al.* (2000), neste método, a redução do MTT a formazan é proporcional a quantidade de parasitos vivos. Especificamente para os ensaios de prospecção de substâncias leishmanicidas, o ensaio de MTT tem algumas desvantagens porque o número de parasitos necessários para os experimentos é muito grande, dentro da linearidade do método. Ademais, alguns compostos ou produtos naturais podem reagir quimicamente com o MTT e reduzi-lo a formazan, levando a obtenção de resultados falso-negativos, inviabilizando este sistema de análise.

Outras metodologias existentes utilizam parasitos modificados geneticamente com genes repórter específicos que facilitam a triagem de agentes antimicrobianos contra patógenos intracelulares. Estes ensaios incluem a utilização de formas amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares estavelmente expressando genes repórter para luciferase, b-galactosidase ou proteína fluorescente verde, por exemplo (Serenó et al., 2001).

Os ensaios em que são utilizados os parasitos na forma intracelular representam intimamente a infecção natural. São utilizadas formas amastigotas dos parasitos intramacrófagos que mimetizam a forma do parasito *in vivo*. Nestes ensaios, podem ser utilizados macrófagos derivados de camundongo ou linhagens estabelecidas derivadas de monócitos humanos (Buckner et al., 2005a). Neste modelo, além de se avaliar a atividade citotóxica para

o parasito, pode-se fazer inferências sobre a toxicidade seletiva dos compostos avaliados já que se determina também a viabilidade celular que simplifica muito a triagem para drogas de maior seletividade (Buckner et al., 1996). Uma das restrições desta metodologia é que a triagem de drogas para os vários patógenos intracelulares é complicada devido à dificuldade de medir o número de patógenos que permanecem viáveis após o tratamento com as drogas. Ademais, para alguns ensaios como os de macrófagos de camundongo, a quantificação é realizada por leitura direta (contagem de células por microscopia óptica, com a contagem de número determinado de campos) o que depende da experiência e atenção do operador, podendo ocorrer erro por uma sub ou superestimação do efeito leishmanicida de determinada amostra. Ademais, apesar de ser o sistema que mais se aproxime do modelo *in vivo*, é tido como muito laborioso.

Outros ensaios desta natureza, utilizando a forma intracelular do parasito cultivadas em linhagens imortalizadas derivadas de monócitos humanos, também podem utilizar a citometria de fluxo. Este método permite a quantificação da interação parasito-monócitos humanos na presença ou não dos agentes leishmanicidas. Estes ensaios são considerados mais quantitativos, comparando-se com as técnicas microscópicas convencionais, com a vantagem da análise de um número grande de células sabidamente importantes para a avaliação de fármacos (Di Giorgio et al., 2000). Recentemente foi descrito um ensaio baseado em citometria de fluxo, onde os autores comprovaram a possibilidade de acesso simultâneo à atividade e seletividade de compostos, mostrando assim a multiparametricidade de ensaios envolvendo citometria de fluxo (Miranda *et al.*, 2015). Neste ensaio, os autores realizaram estudos *in vitro* através de infecção de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em uma linhagem de macrófagos murino (J774). O método compreende um procedimento em uma única etapa que permitiu determinar simultaneamente o índice de seletividade de um determinado composto de uma forma sensível e acurada, fornecendo informações adicionais da interação do composto teste, parasitos e célula hospedeira, sendo também aplicável para outros tripanossomatídeos com multiplicação intracelular. Semelhante a este ensaio, o nosso grupo descreveu outro ensaio utilizando a citometria de fluxo com foco em desenvolvimento de ensaios preditivos para descoberta de compostos bioativos leishmanicidas (Bandeira, 2013). Neste ensaio foi utilizado o sangue periférico humano e *Leishmania* marcadas com o fluorocromo FITC, permitindo avaliação da redução de internalização dos parasitos e citotoxicidade (imunotoxicidade).

1.6 Avaliação da citotoxicidade e da produção de citocinas intracelulares *in vitro* em ensaios com cultura de sangue total

A imunotoxicidade de drogas e outros compostos de uso humano é bem reconhecida como perigosa. Imunotoxicidade pode ser definida como o efeito adverso de agentes químicos ou não, sobre o sistema imune. O efeito pode aumentar a atividade imune manifestada pela alta hipersensibilidade ou autoimunidade, ou diminuição da atividade imune, com reduzida habilidade de controlar infecções ou aumento da incidência do câncer. Até o presente momento, poucos modelos *in vitro* e *in vivo* estão disponíveis para avaliação de imunotoxicidade de maneira padronizada. As diferenças na resposta do sistema imune do hospedeiro, bem como a especificidade de alguns dos agentes a serem testados, tornam necessário o desenvolvimento de novos sistemas preditivos, utilizando células humanas *in vitro* (Carfi et al., 2007).

No que concerne aos agentes potencialmente perigosos, imunotóxicos, vários pesquisadores estão centrados na padronização de metodologias para detecção de toxicidade de novos compostos *in vitro*. Estes métodos incluem a utilização de leucócitos humanos e tem sido amplamente utilizados em estudos de imunofarmacologia (Langezaal et al., 2001). Como amostras de sangue de doadores e pacientes são facilmente acessíveis, numerosos estudos têm sido conduzidos utilizando células do sangue periférico humano. A alta sensibilidade de leucócitos pode ser facilmente afetada e/ou modulada por tais procedimentos, auxiliando assim, uma investigação utilizando sangue total humano, procedimento este que está começando a se popularizar no meio científico.

Um grande número de aplicações em farmacologia e toxicologia tem emergido nos anos recentes. O modelo pode ser desenvolvido utilizando-se estímulos *in vitro* para acessar qualquer propriedade imunomoduladora aguda de agentes testes. Assim, um modelo simples de sangue total oferece uma variedade de oportunidades para se avaliar as funções de células imunes como a resposta celular e humoral. A avaliação neste sistema também permite analisar o efeito de agentes químicos nas funções de macrófagos e linfócitos T e inferir seu potencial citotóxico e imunomodulador (Wagner & Jurcic, 1991; Inoue et al., 2002).

Os ensaios de estimulação de sangue total são úteis para medida de citocinas devido ao fácil acesso às amostras de doadores saudáveis ou pacientes e requer o mínimo de processamento. Assim, o ensaio mimetiza o microambiente natural e permite estudar ativação celular e produção de citocinas *in vitro*. A estimulação de sangue total tem sido utilizada para investigar a resposta celular a vários estímulos, incluindo endotoxina bacteriana (LPS), antígenos, alergênicos e antibióticos. Vários usos clínicos de ensaios de estimulação de sangue total tem sido indicados para avaliação de doenças auto-imunes, monitoramento de drogas, eficácia de vacinas e imunotoxicidade. Portanto, cultivo de sangue total pode ser útil para se

estudar efeitos de potenciais alergênicos e/ou substâncias antigênicas e drogas na ativação de células imune e secreção de citocinas (Thurm & Halsei, 2005).

Até o presente, existem poucos ensaios validados *in vitro* e progressos significantes podem ser alcançados para promover o estabelecimento de novos métodos para medir imunotoxicidade/imunomodulação (Carfi et al., 2007).

Desta forma, um dos parâmetros que poderia vir a ser considerado como de eleição no processo de descoberta de novos fármacos com atividade antiparasitária seria sua capacidade de ativar uma resposta imune de perfil de produção de citocinas do tipo 1 (inflamatórias). Desta forma, em conjunto com a capacidade do fármaco em eliminar o parasito, a ativação do sistema imune pode conferir uma eliminação mais eficiente da infecção, constituindo um novo alvo (Menezes *et al.*, 2015). Este parâmetro tem então sido demonstrado como de altíssima relevância para futuros novos fármacos a serem empregados na terapêutica das leishmanioses (Saha *et al.*, 2011). Ademais, outro fator interessante a se considerar é a via de administração. Sendo esta predominantemente endovenosa ou intramuscular, uma aplicação direta do fármaco poderia levar à um impacto praticamente simultâneo sobre os leucócitos do sangue periférico. Assim, a necessidade do entendimento deste possível impacto, bem como de uma possível imunomodulação farmacológica torna-se altamente importante em termos de parâmetros para o descoberta de novas drogas leishmanicidas.

Contudo, ainda são poucos os ensaios preditivos na área de doenças negligenciadas que permitem avaliação além da atividade antiparasitária e citotóxica, também da atividade imunomoduladora no contexto *in vitro* utilizando o sangue periférico humano. No contexto das leishmanioses, o sistema imune possui um papel chave, em resposta à infecção, auxiliando muitas vezes a atuação do fármaco por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-12, neste caso, favorecendo à eliminação da infecção. Desta forma, um fármaco que além da capacidade de destruição do parasito tivesse a capacidade de ativar uma resposta imune pró-inflamatória, seria tido como de eleição na terapêutica da doença. Neste sentido, nosso grupo tem proposto o desenvolvimento de ensaios preditivos com tal complexidade, principalmente quando se considera a escassez destas informações na literatura no contexto de doenças como leishmaniose, visando acelerar o processo de descoberta de novos fármacos, fato ainda insipiente na área de doenças negligenciadas.

2. JUSTIFICATIVA

As opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses são insuficientes considerando problemas relacionados a baixa eficácia, elevada toxicidade e, recentemente, a emergência de cepas resistentes. Esse cenário é agravado pelo número limitado e pela falta de inovação nos programas de desenvolvimento de novos fármacos na área de doenças negligenciadas. O nosso grupo tem realizado pesquisas com vistas à descoberta de novos protótipos úteis para o desenvolvimento de novos fármacos com atividades antiparasitária, anti-tumoral, imunomoduladora, entre outros, estando apoiado em estudos e projetos para a melhoria dos conhecimentos sobre a biodiversidade e síntese de novas moléculas.

Neste contexto, o grupo possui ampla experiência na proposição de novas metodologias e processos envolvendo a citometria de fluxo. Recentemente, foi proposto, o estabelecimento de ensaios biológicos para avaliação da capacidade de fagócitos do sangue periférico humano em internalizar formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, no contexto *in vitro*. Este ensaio se mostrou uma excelente ferramenta para estudos de interação parasito-hospedeiro, bem como um método para avaliação de atividade biológica de extratos vegetais e substâncias sintéticas, uma vez que permite a análise de um grande número de parâmetros de forma sistemática e sem influência do analista. Buscando ampliar o estudo da imunotoxicidade farmacológica, com vistas a triagem de novos compostos e ao aprimoramento da metodologia em desenvolvimento por nosso grupo, o presente trabalho propôs a incorporação da análise funcional da atividade de leucócitos humanos por meio do estudo do perfil de citocinas. Este racional é baseado no conhecimento sobre a infecção por *Leishmania* em células alvo do parasitismo, que poderia induzir um perfil relacionado a resistência (com a presença de TNF- α e IL-12) ou susceptibilidade (com a presença de IL-10) a infecção. Diante do exposto, a incorporação da análise de citocinas intracitoplasmáticas na metodologia em desenvolvimento pretende contribuir para se avaliar simultaneamente, a partir do mesmo analito, informações sobre a citotoxicidade (imunotoxicidade), atividade leishmanicida e imunomoduladora de forma quantitativa. Em termos de inovação, esta metodologia representaria um importante avanço no contexto de descoberta de fármacos, além de contribuir para redução da utilização de animais em estudos preliminares de predição da atividade de potenciais protótipos para a indústria farmacêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis*, buscando o aprimoramento de um novo ensaio pré-clínico funcional multiparamétrico por citometria de fluxo.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica, leishmanicida e imunomoduladora, empregando-se sangue humano e dois fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses: Antimoniato de N-Metil Glucamina (Glucantime®, Sanofi-Aventis) e Anfotericina B (Fungizone®, Bristol-Myers Squibb), por meio do:

- Estudo da viabilidade de monócitos e neutrófilos quanto à indução de apoptose tardia e necrose;
- Análise do potencial microbiocida através da quantificação da redução de *L. braziliensis* internalizadas em monócitos e neutrófilos;
- Avaliação do potencial imunomodulador farmacológico, através da quantificação da produção de citocinas intracelulares pró-inflamatórias e imunoreguladoras;
- Identificação da internalização do parasito por fagócitos do sangue periférico através de análises morfológicas.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O estudo proposto seguiu a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram encaminhados para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Renée Rachou, e aprovados em 2008 (Parecer número 21/2008 – CEPESH – CPqRR).

4.2 Caracterização da população avaliada

Foram coletadas amostras de sangue de 17 doadores voluntários saudáveis, sendo nove do sexo feminino e oito do sexo masculino, com idade entre 18 e 30 anos, provenientes da região de Belo Horizonte/MG. As amostras, de sangue venoso, foram então divididas, sendo 5 mL-EDTA para realização da contagem global de leucócitos e 10 mL-Heparina sódica para realização dos ensaios imunológicos.

4.3 Critérios de exclusão

Não foram incluídos neste estudo doadores com sinal de leucocitose, avaliada através da contagem global de leucócitos, que sabidamente interfere na resposta imune do indivíduo, visando assim aumentar a acurácia do estudo.

4.4 Obtenção e marcação de formas promastigotas de *L. braziliensis*

As formas promastigotas de *L. braziliensis*, cepa M2903 (MHOM/BR/1986/MSS), foram obtidas a partir de cultivos em meio líquido *Grace's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – LGC, Cotia, SP, Brasil) inativado, L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 2mM e penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), pH 6,5 e mantidas em estufa BOD TE-371 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) à temperatura de 26°C, por 5 dias (fase estacionária de crescimento) em meio Grace's. Os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL, e

a suspensão foi submetida à centrifugação 10 x g, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os parasitos foram recuperados após um período de repouso de 30 minutos em estufa B.O.D a 23°C, coletando-se o sobrenadante que foi transferido para outro tubo, sendo o sedimento desprezado. Em seguida, os parasitos foram lavados por centrifugação a 480 x g, durante 10 minutos a 4°C com 20 mL de PBS (“phosphate buffered saline”) 10% SFB pH 7,2. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS 10% SFB pH 7,2. Os parasitos foram contados e a suspensão ajustada para o número necessário para os ensaios de fagocitose (10^7 parasitos/mL). Para a marcação das formas promastigotas de *Leishmania*, quantidades equivalentes de parasitos e da preparação do fluorocromo AlexaFluor 647 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 1 mL de parasitos na concentração de 10^8 parasitos/mL + 1 mL de AlexaFluor 647 na concentração de 3,2 μ g/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C em estufa 5% CO₂. Após a incubação, estes foram lavados por centrifugação a 480 x g, durante 10 minutos a 18°C com PBS 0,015M, pH 7,4 – PBS 1x e ressuspenso em PBS 1x. Uma alíquota foi separada para avaliação no citômetro de fluxo a fim de avaliar a intensidade de fluorescência apresentada pelos parasitos marcados com a preparação de AlexaFluor 647. A qualidade da marcação foi avaliada através da intensidade média de fluorescência (IMF) entre 10^2 e 10^3 apresentada pela maioria (no mínimo 60%) dos parasitos marcados (Figura 2).

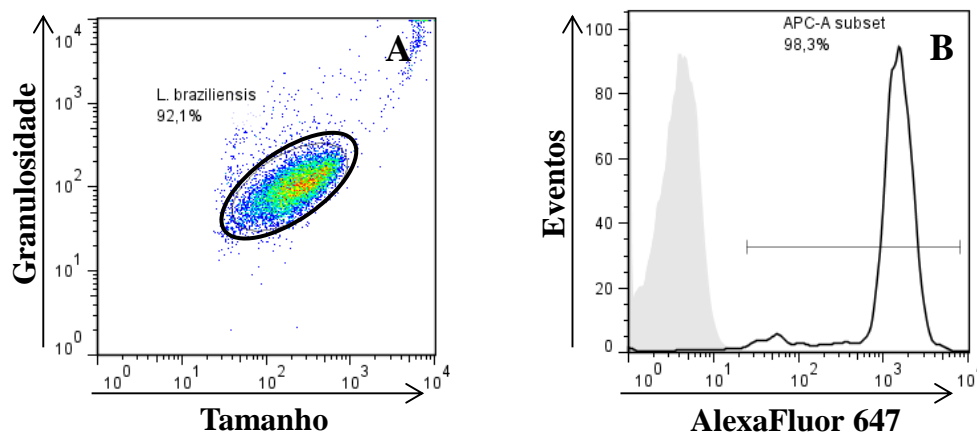


Figura 2 - Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*. A Figura “A” representa o perfil de promastigotas de *L. braziliensis*, selecionadas no gate “Promastigotas” em gráfico de distribuição pontual de tamanho *versus* granulosidade. A Figura “B” representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com Alexa Fluor 647 em gráfico de histograma.

4.5 Determinação das condições do ensaio proposto

A determinação das condições para a realização do experimento e validação da metodologia proposta foram realizadas de acordo com o estudo realizado por Bandeira (2013). Culturas contendo 500.000 leucócitos e 250.000 parasitos marcados com AlexaFluor 647 foram incubados sob homogeneização a 37°C e 5% CO₂, em condições de esterilidade, por seis horas na presença de Antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime® 81 mg/mL de antimônio pentavalente, Ampola injetável 5mL, Sanofi-Aventis) e Anfotericina B (Fungizone®, liofilizado injetável 50 mg, Bristol-Myers Squibb). Para o Glucantime®, a concentração utilizada foi de 0,81 mg/mL. Já para a Anfotericina B, foi utilizada a concentração de 25 µg/mL.

Em todos os ensaios, foram utilizadas culturas controles de célula (CC), célula e parasito na presença do solvente (NT), bem como das duas diferentes drogas utilizadas como tratamento - Glucantime® e Anfotericina B. Ainda, como controles internos, foram utilizadas culturas contendo apenas células e parasito (CP), além de células estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), afim de manter um maior padrão de qualidade quanto à observação e obtenção dos resultados.

4.6 Avaliação da atividade citotóxica do Glucantime® e da Anfotericina B em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis*: marcação com 7-amino actinomicina (7-AAD)

Para avaliação da atividade citotóxica de ambos os fármacos, foi utilizado o mesmo procedimento descrito por Bandeira (2013). Resumidamente, 200 µL (500.000 leucócitos) das culturas foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 2 µL de anti-CD14FITC (Tabela 1) e re-incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adicionados 3 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD Biosciences) de hemácias no vórtex e as células foram incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz. Os tubos foram submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 500 µL de PBS 1x contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica – PBS-W gelado e 3 mL de PBS-W contendo 0,5% de saponina – PBS-P gelado e os tubos submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 3 mL de PBS-W gelado e novamente submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. As suspensões celulares

(200 µL - aproximadamente 500.000 leucócitos) foram então transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 2,5µL de 7AAD (7-amino actinomicina D, PHARMINGEN®, cod. 559925, Becton Dickinson - excitações 488nm, emissão 670nm/ 3ª cor). A cultura foi incubada em banho de gelo, por 10 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Em sequência, 5.000 monócitos foram adquiridos e a análise do parâmetro foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCanto II – BD. Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1.).

4.7 Avaliação da atividade leishmanicida e produção de citocinas intracelulares em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime® e Anfotericina B

Após as duas primeiras horas de incubação das culturas, Brefeldina A - BFA (10 µg/mL) foi adicionada, seguindo-se a re-incubação por mais 4 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 220µL de EDTA (2 mM) as culturas, sendo estas posteriormente incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

Para avaliação do marcador de superfície celular (CD14-FITC), bem como o perfil de citocinas intracelulares de monócitos e neutrófilos, após incubação, 200 µL (500.000 leucócitos) das culturas foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 2 µL de anti-CD14-FITC (Tabela 1) e re-incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adicionados 3 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD Biosciences) de hemácias no vórtex e as células foram incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz. Os tubos foram submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 500 µL de PBS 1x contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica – PBS-W gelado e 3 mL de PBS-W contendo 0,5% de saponina – PBS-P gelado. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Os tubos foram vertidos, a suspensão celular ressuspensa em 3 mL de PBS-W gelado e novamente submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. As suspensões celulares (200 µL - aproximadamente 500.000 leucócitos) foram então transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL contendo 2 µL de anticorpos anti-citocinas (TNF-α, IL-12 e IL-10 - Tabela 1) e, em seguida, incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 2 mL de PBS-P gelado/tubo, sendo os tubos submetidos à centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram

vertidos, sendo as células ressuspensas seguida de adição de 2 mL de PBS-W gelado/tubo. Os tubos foram centrifugados novamente a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Após centrifugação, foram então vertidos e a suspensão celular ressuspensa e um volume de 200 µL de solução fixadora gelada/tubo. Após 15 minutos a 4°C, 5.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCanto II – BD. Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1.).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da marcação de superfície celular e citocinas intracelulares em monócitos.

Marcador	Fluorocromo	Clone	Função
Anti-CD14	FITC	M5E2	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo.
Anti-TNF- α	PECy7	MAb11	Inflamação local, ativação endotelial.
Anti-IL-12	PE	BIO Hp40	Ativa células NK, induz a diferenciação de células T CD4 em células Tipo 1.
Anti-IL-10	PE	JES3-9D7	Potente supressor das funções dos macrófagos.

É importante ressaltar que os resultados só foram considerados válidos nas análises em que foi observada uma leitura de 5.000 monócitos/tubo e no mínimo 200 monócitos expressando determinado marcador de superfície celular ou citocina.

4.8 Análise dos dados

- Estratégias de análise de citotoxicidade, interação monócito e neutrófilo-*Leishmania* e produção de citocinas intracelulares em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano

Para alcançar os objetivos propostos de avaliação do perfil imunofenotípico de monócitos e de neutrófilos do sangue periférico, duas diferentes estratégias de análise foram empregadas.

Inicialmente, monócitos e neutrófilos foram identificados e selecionados por uma janela - “gate”, em gráficos de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC) (Figura 3A). Após seleção da população de interesse, foi possível avaliar o percentual de monócitos e neutrófilos viáveis, sendo esta obtida em gráfico de densidade de fluorescência 7AAD-PerCP *versus* fluorescência CD14-FITC para monócitos e gráfico de densidade de fluorescência 7AAD-PerCP *versus* granulosidade celular (Side Scatter – SSC) para neutrófilos, sendo considerados não viáveis aqueles que apareceram no quadrante duplo positivo (Q2). Da mesma forma, foi também possível avaliar o percentual de monócitos e neutrófilos que interagiram com formas promastigotas de *L. braziliensis*, em gráfico de densidade de fluorescência Leish Alexa Fluor 647 *versus* fluorescência CD14-FITC, representado na Figura 3B.

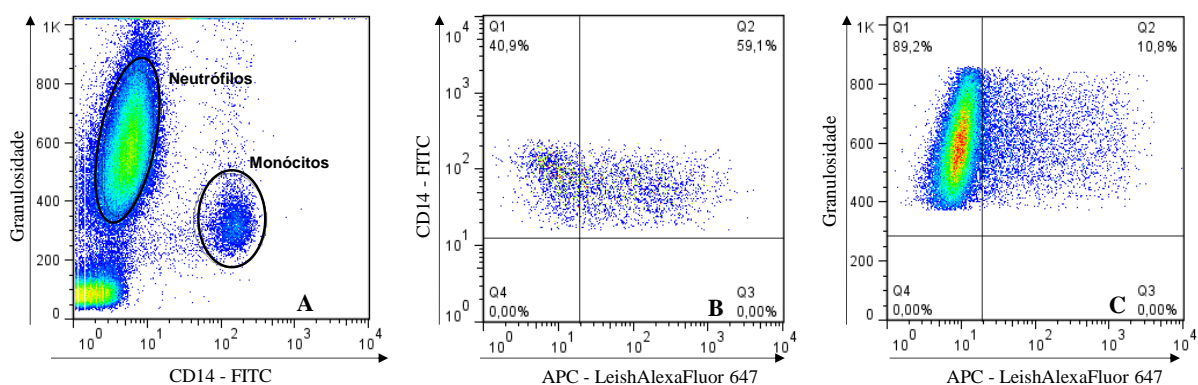


Figura 3 - Análise representativa da interação monócito-*Leishmania* e neutrófilo-*Leishmania* por citometria de fluxo. A Figura “A” representa o perfil da população de monócitos e neutrófilos, selecionados nos gates “Monócitos” e “Neutrófilos” em gráfico de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulosidade (SSC). A Figura “B” representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com Alexa Fluor 647, em gráfico de densidade de fluorescência Leish Alexa Fluor 647 *versus* fluorescência CD14-FITC. A Figura “C” representa o perfil de análise da população de neutrófilos na presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com Alexa Fluor 647, em gráfico de densidade de fluorescência Leish Alexa Fluor 647 *versus* granulosidade. Monócitos e Neutrófilos que interagiram com o parasito estão representados no quadrante duplo positivo (Q2).

A próxima estratégia correspondeu à avaliação da produção de citocinas intracelulares de monócitos e neutrófilos. Assim como na estratégia anterior, monócitos e neutrófilos foram identificados e selecionados por uma janela - “gate”, em gráficos de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulosidade celular (*Side Scatter* - SSC). Através da seleção das populações de interesse, foi possível analisar a produção de citocinas induzidas em monócitos (CD14-FITC) e neutrófilos (*Side Scatter* – SSC), dentro de cada janela – “gate” específica para a subpopulação destas células do sangue periférico *versus* a fluorescência (Tabela 1), relacionada a cada citocina (Figura 4). As estratégias utilizadas para análise de neutrófilos, que correspondiam à obtenção de sua população através da identificação em janela – “gate”, em gráficos de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulosidade celular (*Side Scatter* – SSC) para posteriores análises de interação neutrófilo-*Leishmania*, bem como a produção de citocinas intracelulares foram possíveis por base nos trabalhos de Kurt-Jones et al., (2002) e Antal-Szalmas et al., (1997). Nestes estudos, foi demonstrada a possibilidade de identificação da população de neutrófilos, por apresentar baixa marcação para CD14 e alta granulosidade (SSC^{HIGH}).

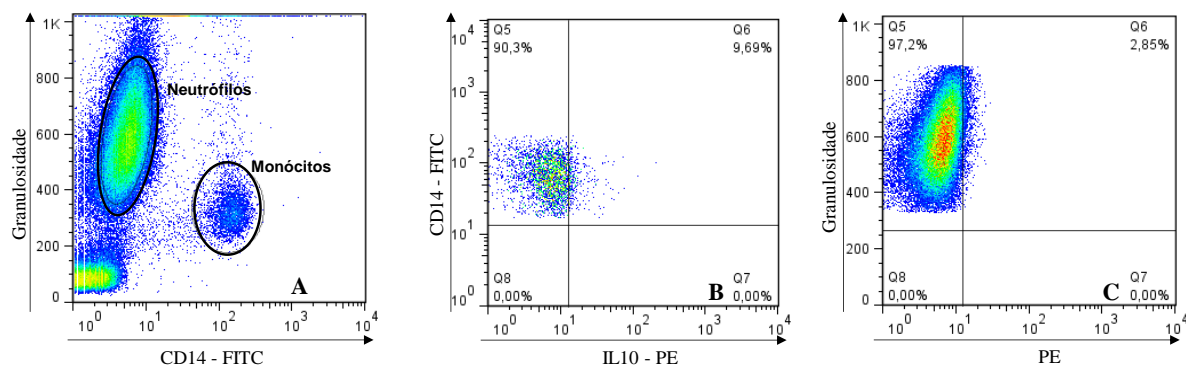


Figura 4 - Análise da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico através de citometria de fluxo. A Figura “A” representa o perfil da população de monócitos e neutrófilos, selecionados no gate “Monócitos” e “Neutrófilos”, em gráfico de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* granulosidade (SSC). A Figura “B” representa perfil de análise da produção de IL-10 por monócitos do sangue periférico por percentual em gráfico de densidade de fluorescência CD14-FITC *versus* densidade de fluorescência IL-10PE. A Figura “C” representa perfil de análise da produção de IL-10 por neutrófilos do sangue periférico por percentual em gráfico de densidade de granulosidade (SSC) *versus* densidade de fluorescência IL-10PE. Monócitos e neutrófilos produtores de IL-10 estão representados no quadrante duplo-positivo (Q2).

4.9 Análise morfológica do perfil de interação de *L. braziliensis* com monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano por microscopia de luz e de fluorescência

Após ensaio *in vitro* de interação de células do sangue periférico com formas promastigotas de *L. braziliensis*, realizou-se a lise dos eritrócitos e fixação das células, como

descrito nos itens 4.6 e 4.7. Aproximadamente 100µL da suspensão celular foi aderido em lâminas de microscopia (Labor Imports[®], Osasco, São Paulo, Brasil) através de centrífuga de citospin (Cytospin, SHANDON[®]) a 350 x g, por oito minutos. Após o processo, as lâminas foram mantidas por 24 horas à temperatura ambiente (25°C). Após, as lâminas foram então destinadas, em parte, à coloração pelo método de May-Grunwald-Giemsa. Para tal, as lâminas, foram fixadas com metanol absoluto (Sigma-Aldrich) e coradas com solução May-Grunwald-Giemsa (Sigma-Aldrich) tamponado 10%, por cinco minutos, e visualizadas em microscópio óptico CX-31 (NIKON, E400[®]) em lente objetiva de 40x/0.65, e fotografado em microscópio BX41 (Olympus[®]), ao qual se encontrava acoplado uma câmerea digital Q-Color 3 (Olympus[®]). As imagens digitais foram tratadas para ajuste de tons de cinza, contraste, brilho e foco, utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS4[®], sendo estas então transferidas e adequadas para pranchas, utilizando-se o programa Adobe Illustrator CS4[®]. O restante das lâminas foi destinado à marcação de imunofluorescência, sendo esta realizada por 20µL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride – Sigma Aldrich) diluído 1:500 em PBS/BSA 2% e incubados por 15 minutos ao abrigo da luz. Após este período, as lâminas foram submetidas à cinco ciclos de lavagem com PBS, sendo cada ciclo de três minutos. As lâminas e lamínulas foram então montadas com vectashield[®] e armazenadas a 4°C, protegidas da luz. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio confocal equipado com objetivas regulares (Nikon Eclipse Ti). Para visualização em formato tridimensional, as imagens foram processadas para 3D, utilizando um scan de seção Z, sendo a aquisição das imagens permitidas pela função NIS Elements 4.20 do microscópio. O processamento e aquisição das imagens foi realizado pelo programa Volocity 6.3 (Perkin Elmer).

4.10 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0.0 (San Diego, CA). Os dados apresentaram distribuição não paramétrica, desta forma, para análise comparativa entre os grupos, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade citotóxica do Glucantime® e da Anfotericina B em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis*: marcação com 7-amino actinomicina (7-AAD)

A Figura 5 representa a análise quantitativa da marcação de apoptose tardia/necrose (células 7AAD⁺) em monócitos e neutrófilos do sangue humano de doadores saudáveis. Foram comparadas culturas controle contendo apenas células (CC) com culturas contendo células na presença de ambos os fármacos (Glucantime® e Anfotericina B), objetivando-se a análise de citotoxicidade (imunotoxicidade). Foi utilizada como percentual de morte máximo aceitável no ensaio, conforme determinado por Bandeira (2013), o percentual de 20% de células 7AAD⁺. De acordo com os resultados, observa-se que ambos os fármacos apresentaram baixa citotoxicidade nas concentrações utilizadas no ensaio, estando menor que 20% no caso de monócitos e menor que 10% no caso de neutrófilos.

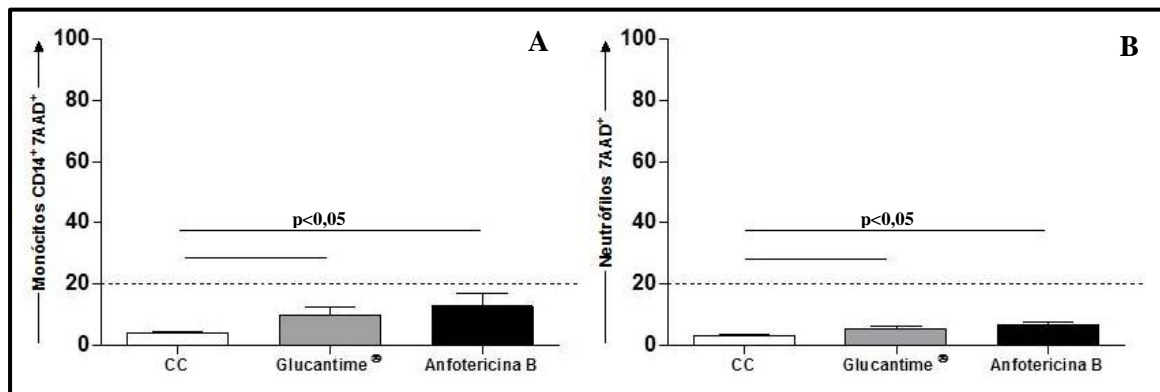


Figura 5 - Avaliação do efeito do Glucantime® e Anfotericina na viabilidade de monócitos (A) e neutrófilos (B) do sangue periférico de indivíduos dos grupos: Controle de Células, que corresponde às células na presença de meio de cultura (CC, n = 10), Glucantime®, que corresponde à células na presença de Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 10) e Anfotericina B, que corresponde às células na presença de Anfotericina B a 25 µg/mL (Anfotericina B, n = 10). Os resultados estão apresentados como percentual médio e desvio padrão de células 7-AAD⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras.

5.2 Avaliação da atividade leishmanicida e produção de citocinas intracelulares em monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime® e Anfotericina B

5.2.1 Avaliação da interação Monócito-*Leishmania* e Neutrófilo-*Leishmania* (atividade leishmanicida)

A Figura 6 representa a análise da interação de formas promastigotas de *L. braziliensis* com monócitos e neutrófilos do sangue periférico de 17 indivíduos saudáveis doadores de sangue. Nesta abordagem, foi realizada uma análise comparativa entre às culturas não tratadas (NT) e tratadas com Glucantime® e Anfotericina B, sendo a atividade leishmanicida foi avaliada pela redução do percentual de monócitos CD14⁺Leish⁺ (*L. braziliensis* marcada com Alexa Flúor 647). Os dados demonstram uma redução significativa na interação monócitos-*Leishmania* (Figura 6A) e neutrófilos-*Leishmania* (Figura 6B) nos grupos Glucantime® e Anfotericina B ($p < 0,0001$) quando comparados aos respectivos grupos NT.

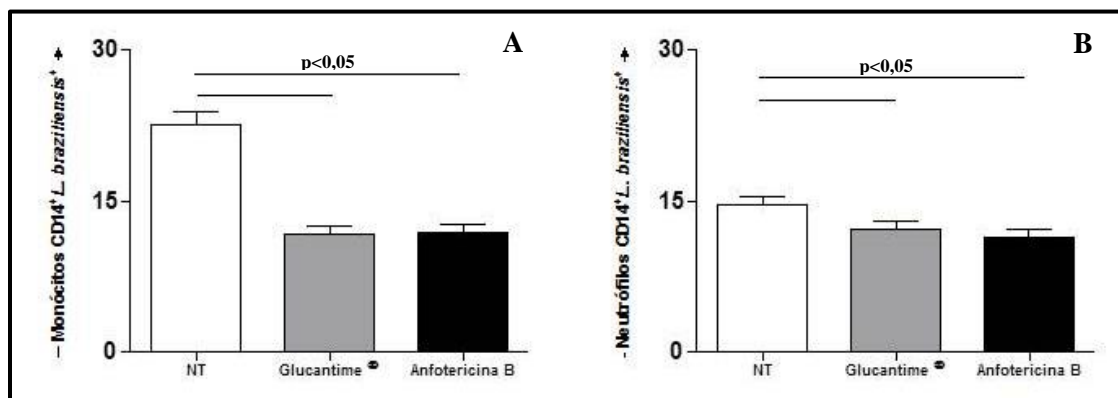


Figura 6 - Avaliação do efeito do Glucantime® e Anfotericina na interação de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* com monócitos (A) e neutrófilos (B) do sangue periférico de indivíduos dos grupos: Não Tratado, que corresponde às células na presença do parasito e solvente (NT, n = 17), Glucantime®, que corresponde à célula na presença do parasito e Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 17) e Anfotericina B, que corresponde a mesma condição anterior, na presença de Anfotericina B 25 µg/mL (Anfotericina B, n = 17). Os resultados estão apresentados como valores médios e desvio padrão do percentual de células CD14⁺Leish⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras.

5.2.2 Avaliação da produção de citocinas intracelulares em Monócitos

A Figura 7 representa a análise do perfil de produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) e imunoreguladora (IL-10) por monócitos do sangue periférico humano. Tais citocinas são extremamente importantes no contexto da imunopatologia das leishmanioses, pois estão relacionadas à manutenção da infecção (IL-10) em respostas de perfil adaptativo Th2 ou na eliminação da infecção (TNF- α e IL-12) em respostas de perfil Th1.

Observou-se um aumento significativo no percentual das citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladora ($p < 0,0001$) para monócitos CD14⁺IL-10⁺, CD14⁺TNF- α ⁺ e CD14⁺IL-12⁺ nos grupos não tratado (NT), bem como os grupos tratados com os fármacos (Glucantime® e Anfotericina B), em relação ao grupo de produção basal das células (CC) (Figura 7). Porém, ao

se comparar o grupo não tratado (NT) com aqueles que tiveram a presença dos fármacos, não houve diferença ($p > 0,05$) para a porcentagem de monócitos IL-10⁺, TNF- α ⁺ e IL-12⁺.

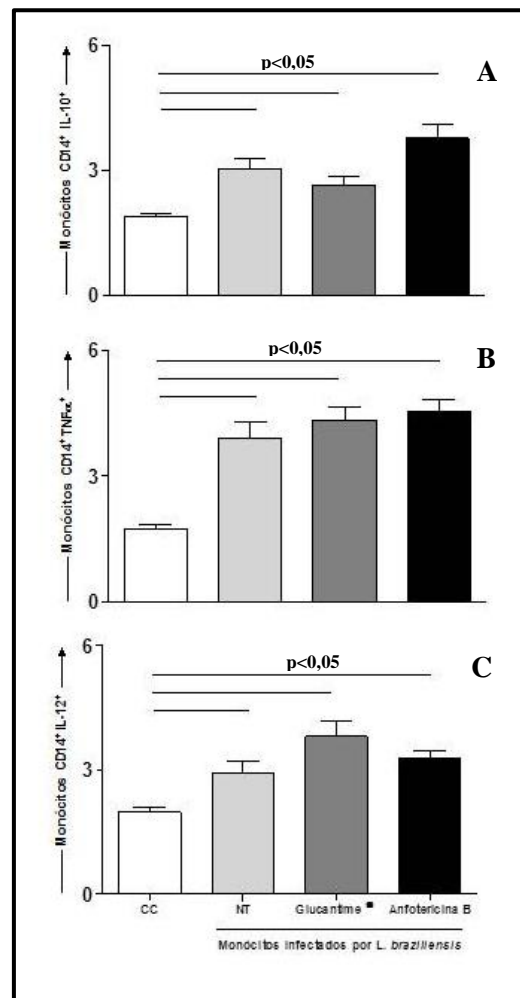


Figura 7 - Avaliação da produção de citocinas intracelulares IL-10 (A), TNF- α (B) e IL-12 (C) em monócitos CD14⁺ do sangue periférico cultivado na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish⁺), na presença ou não dos fármacos, sendo: Controle (CC, n = 17), Não Tratada (NT, n = 17), Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 17), e Anfotericina B a 25 μ g/mL (Anfotericina B, n = 17). Os resultados estão apresentados como percentual médio e desvio padrão de monócitos CD14⁺CITOCINAS⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos CC, NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras.

5.2.3 Avaliação da produção de citocinas intracelulares em Neutrófilos

A Figura 8 representa a análise do perfil de produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) e imunoreguladora (IL-10) por neutrófilos do sangue periférico humano.

Assim como nos monócitos, observou-se um aumento significativo no percentual das citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladora ($p < 0,0001$) para neutrófilos SSC^{HIGH}IL-10⁺, neutrófilos SSC^{HIGH}TNF- α ⁺ e neutrófilos SSC^{HIGH}IL-12⁺ no grupo não tratado (NT), bem como

nos grupos tratados com os fármacos (Glucantime® e Anfotericina B), em relação ao grupo de produção basal das células (CC) (Figura 8).

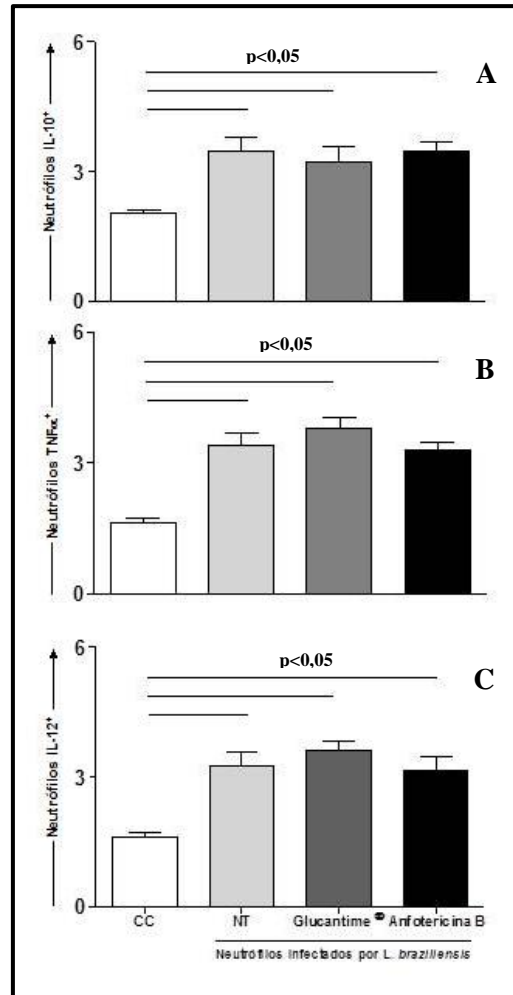


Figura 8 - Avaliação da produção de citocinas intracelulares IL-10 (A), TNF- α (B) e IL-12 (C) em neutrófilos do sangue periférico cultivados na presença de formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* (Leish⁺), tratadas ou não com os fármacos, sendo: Controle (CC, n = 17), Não Tratado (NT, n = 17), Glucantime® a 0,81 mg/mL (Glucantime®, n = 17), e Anfotericina B a 25 μ g/mL (Anfotericina B, n = 17). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão do percentual de neutrófilos-CITOCINAS⁺ em formato de gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos CC, NT, Glucantime® e Anfotericina B estão representadas pelas linhas conectoras.

5.3 Análise morfológica do perfil de interação de *L. braziliensis* com monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano por microscopia óptica de luz e de fluorescência

As Figuras 9 e 10 representam fotomicrografias de leucócitos do sangue periférico humano na presença (culturas não tratadas – NT) ou não (controle de células – CC) de formas

promastigotas de *L. braziliensis*, objetivando-se a comprovação de que existe interação entre estes subtipos celulares e *L. braziliensis* através do ensaio proposto.

Observa-se, através das diferentes técnicas, a presença de células polimorfonucleares sem a presença de material genético extranuclear, em culturas controle de células (CC) por microscopia de luz e de fluorescência, respectivamente (Figuras 9 e 10 – A e B). Diferente do que observado nas culturas com a presença do parasito (NT) (Figuras 9 e 10 – C e D), onde foi possível evidenciar a presença de formas amastigotas de *L. braziliensis* internalizadas em ambos os tipos celulares durante o ensaio. Foi possível ainda, a reconstituição em 3D do núcleo das células polimorfonucleares, bem como o das formas amastigotas de *L. braziliensis* (Figura 10 E, setas brancas).

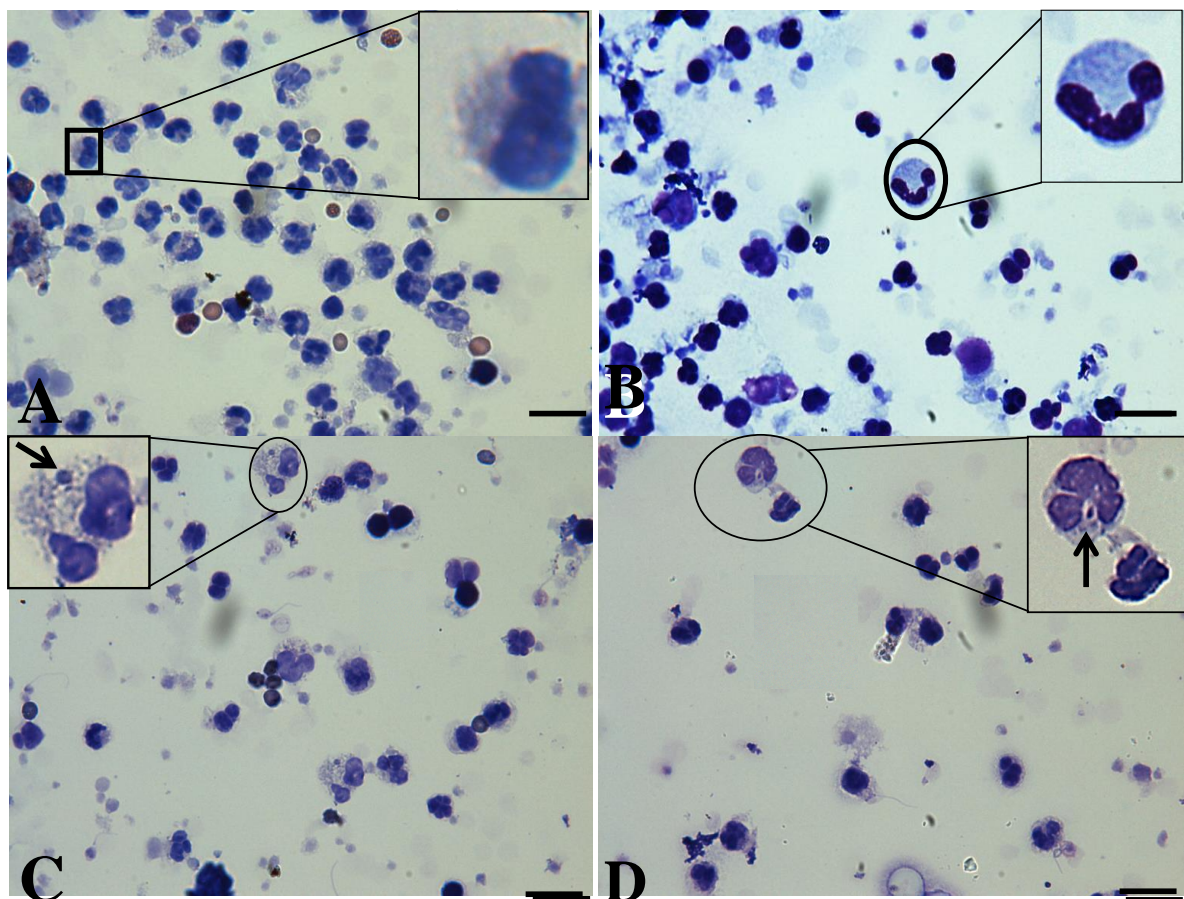


Figura 9 Fotomicrografias de leucócitos do sangue periférico humano contendo ou não formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis* internalizadas. Em A e B, através da microscopia de luz e utilizando a coloração de May-Grunwald-Giemsa, visualiza-se células polimorfonucleares sem a presença de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis*. Em C e D podemos já visulizar as formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis* internalizadas, sendo indicadas pelas setas pretas. Barras equivalentes a: A, B, C e D, 11 μ m.

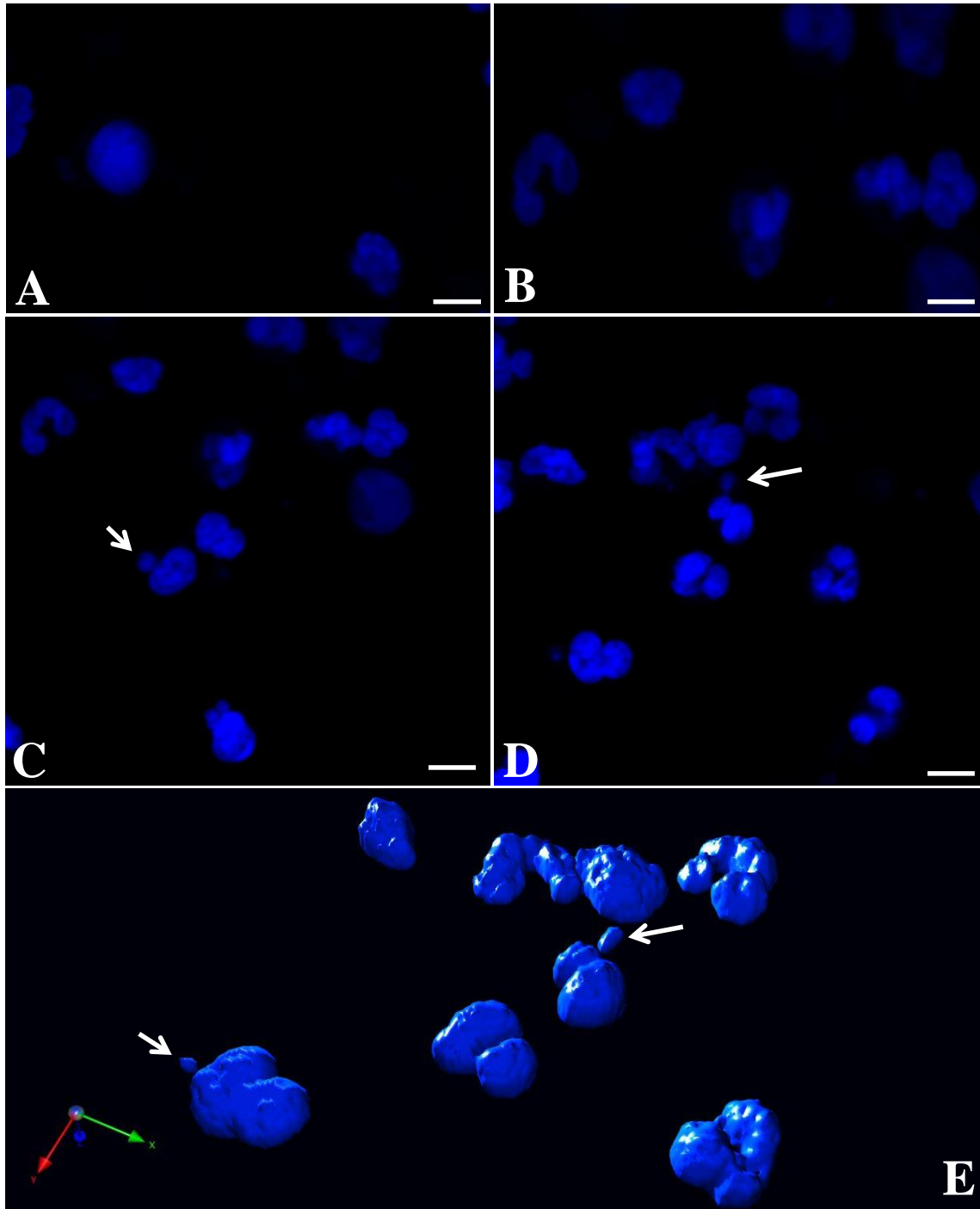


Figura 10 Fotomicrografias de leucócitos do sangue periférico humano contendo ou não formas amastigotas de *L. braziliensis*. Em A e B, utilizando a técnica de microscopia de fluorescência e utilizando o fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), observa-se a marcação de núcleos de células polimorfonucleares sem a presença de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis*. Já em C e D, observa-se a marcação de núcleos de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis*, indicado pelas setas brancas. Em E, visualiza-se a representação em 3D utilizando microscopia de fluorescência, marcadas com DAPI, apresentando o núcleo de formas sugestivas de amastigotas de *L. braziliensis* indicados pelas setas brancas. Barras equivalentes a: A, B, C e D 8 μ m; E não possui valores.

6. DISCUSSÃO

A área de inovação e descoberta de fármacos é tida como uma área muito promissora, principalmente quando falamos em pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos com vistas à sua utilização clínica. É sabido que, apesar de promissora, ainda é uma área muito carente no cenário brasileiro, devido à vários fatores muito além apenas do incentivo público. A presença de grandes multinacionais no mercado, tem levado à uma espécie de parceria entre academia e iniciativa privada, delegando assim à academia a missão dos estudos de alvos farmacológicos, descobrimento e desenvolvimento de novos protótipos promissores, e deixando a indústria como a provedora de investimento financeiro do processo, bem como à responsabilidade da produção e distribuição de medicamentos em larga escala.

Quando abordamos o cenário das doenças negligenciadas (foco deste trabalho), a situação é mais delicada, pois, associado à estes fatores, ainda há uma grande defasagem no processo de descoberta de novas drogas (Menezes *et al.*, 2015). Nestes casos, ainda preconiza-se como fármacos de primeira escolha os mesmos que eram utilizados em décadas passadas, o que evidencia ainda mais a necessidade do desenvolvimento de novos protótipos promissores (Tiuman *et al.*, 2011). O aparecimento de resistência, bem como o aumento de casos/ano são outros fatores estimulantes aos pesquisadores para que possam direcionar seus esforços nesta área.

A proposta deste trabalho, vai então diretamente de encontro com o cenário acima descrito. A necessidade de desenvolvimento de novos protótipos com a finalidade de uso terapêutico na área de doenças negligenciadas, estimula assim o desenvolvimento, padronização e aperfeiçoamento de novas metodologias que permitam acesso ao potencial destes protótipos em relação à sua capacidade de eliminar a infecção no contexto das leishmanioses (através da eliminação do parasito) sem no entanto, o fazer através de citotoxicidade inespecífica, que seria representada pela eliminação de células parasitadas, mas também de células viáveis. Associado a este fato, e foco atual de estudos na área de terapêutica de doenças negligenciadas (neste caso muito bem representada pelas leishmanioses), a ativação do sistema imune surge como uma interessante alternativa suplementar à abordagem farmacológica destas doenças. Neste caso, o objetivo é induzir a eliminação do parasito após estímulos, resultando em um perfil de resposta imune do tipo 1, com produção de IFN- γ , TNF- α , sendo estas citocinas muito importantes para induzir mecanismos efetores de morte, como a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e conseqüente morte do parasito dentro

de sua célula alvo (no caso, monócitos e macrófagos) e controle do parasitismo (Gollob *et al.*, 2015). Desta forma, seria ideal que os fármacos (bem como potenciais protótipos), possuísem três características que os tornariam ideais para o tratamento das leishmanioses: a primeira, seria sua capacidade de eliminar o parasito; a segunda, a capacidade de promover citotoxicidade específica (eliminar apenas o parasito e/ou células parasitadas); e, a terceira, promover uma ativação do sistema imune através da ativação de células alvo do parasitismo e assim contribuir para eliminação da infecção e melhora clínica de pacientes. Desta forma, o presente trabalho surge como uma opção inovadora, em termos de metodologia, que permite o acesso à estes três parâmetros simultaneamente, através da citometria de fluxo. Além disto, por se tratar de uma metodologia preditiva realizada através da cultura de sangue total no contexto *in vitro*, permite uma extrapolação para avaliação simultânea do impacto dos fármacos (e potenciais protótipos) no sangue dos diferentes indivíduos logo após sua administração (há de considerar-se que as quimioterapias anti-*Leishmania* são realizadas por via endovenosa ou intramuscular). Desta forma, pode ser avaliado o efeito imunotóxico e/ou imunomodulador de fármacos utilizados na clínica (o que foi realizado no presente trabalho, com vistas e seu aperfeiçoamento), bem como de novos potenciais protótipos a serem testados. Outro fator interessante, baseia-se na diminuição do uso do modelo animal, utilizando-se em maior escala os modelos celulares nesta fase pré-clínica, tendo em vista a complexidade deste ensaio, a utilização de um modelo de células provenientes do sangue periférico humano (mimetizando ainda mais as condições *in vivo*), bem como sua precisão em termos quantitativos. Esta alternativa é então muito importante em termos de ética e utilização de animais em experimentação. Anteriormente à apresentação e padronização desta nova metodologia descrita por Bandeira (2013), não haviam relatos de ensaios que permitissem acesso aos diferentes parâmetros utilizando monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano para análise e prospecção de novos protótipos com a finalidade de tratamento de doenças parasitárias. Assim, confirma-se o ineditismo desta metodologia, que já havia requisitado um pedido de patente junto ao INPI.

As metodologias disponíveis na literatura incluem a triagem de substâncias contra as formas flageladas do parasito (promastigotas - forma livre) e as formas encontradas em células de mamíferos (amastigotas – intracelular) cultivadas *in vitro* em condições axênicas podendo estas formas ser utilizadas em ensaios primários para triagem de substâncias (Gupta & Nishi, 2011). Para a avaliação da viabilidade, considerando este contexto, são utilizados métodos como o MTT, Alamar Blue e outros, além de quantificação por microscopia e/ou citometria de fluxo. Nos ensaios utilizando as formas amastigotas do parasito, comumente utiliza-se

monócitos peritoneais de camundongo como células alvo; além das linhagens de células J774A.1 (ATCC® TIB-67™) “monócitos-like” de camundongos BALB/c ou ainda as células THP-1 (ATCC® TIB-202™) que são monócitos provenientes da leucemia monocítica aguda humana. A avaliação da atividade leishmanicida é então acessada por análise microscópica ou através da citometria de fluxo (Azas et al., 1997; Delgado, 2001; Di Giorgio et al., 2000; Teixeira et al., 2008; Oliveira-Silva et al., 2008; Ordóñez-Gutiérrez et al., 2007; Barroso et al., 2007). Nestes ensaios, para avaliação da citotoxicidade, utiliza-se as respectivas células alvo, as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), sendo avaliada por absorvância através do método de redução da Rezasurina (Rebbestad et al., 2012). Outro tipo celular utilizado comumente nestas avaliações são os fibroblastos provenientes do rim de macaco verde (células “VERO C1008” ou “VERO 76”) (Freire et al., 2005). Kram e colaboradores (2008), levantam a questão de que os ensaios convencionais *in vitro* utilizando MTT não analisam as células individualmente e sim os agregados, não possibilitando assim a avaliação da viabilidade da célula hospedeira, sobrevivência do parasito intracelular e marcadores de resposta imunológica simultaneamente, que poderia ser realizado ao se empregar a técnica de citometria de fluxo, com marcadores individuais específicos.

Os sistemas de cultivo *in vitro*, além de mimetizar o ambiente *in vivo*, possibilitam a triagem de um grande número de compostos de maneira acurada além de se apresentar como uma alternativa à substituição da utilização de animais em estudos relacionados a fases do processo de descoberta de drogas. Recentemente, Viana *et al* (2013, 2015, 2016) realizaram um estudo estabelecendo condições para diferenciação de monócitos em macrófagos em culturas de sangue total de cães. Os autores ainda estabeleceram condições para co-cultivos de macrófagos e linfócitos, além de padronizar um ensaio para testes vacinais com base nas metodologias anteriores, o demonstra a grande aplicabilidade e acurabilidade de sistemas de estudo *in vitro*, fato este que vem de encontro ao ganho metodológico proposto pelo presente estudo, principalmente no tocante à utilização de sangue periférico humano ao invés de linhagens celulares pré-estabelecidas, possibilitando um modelo de estudo mais próximo ao humano e de potencial aplicabilidade nas fases pré-clínicas de descoberta de fármacos, como alternativa para uma diminuição ao número de animais utilizados. Ainda, a utilização da citometria de fluxo como método de análise, permite um acesso quantitativo e individual (em termos de subpopulações celulares) aos parâmetros, o que seria muito interessante, além de outros fatores, em termos de estudos de imunotoxicologia de protótipos candidatos.

Recentemente, Miranda *et al.* (2015), demonstraram a utilização da citometria de fluxo como um novo método para avaliação de atividade e seletividade de compostos contra *T. cruzi*

e chamam atenção para a necessidade de expansão deste modelo para outros tipos parasitários. Estes autores utilizaram então células de linhagem pré-estabelecidas, os macrófagos murinos J774, diferenciando assim de nosso foco, que é sobre leucócitos do sangue periférico humano em um contexto *in vitro* de culturas de sangue total. Assim como o estudo de Miranda *et al.* (2015), o presente trabalho demonstrou ser eficiente para uma avaliação de fármacos que possuam atividade antiparasitária utilizados frequentemente na clínica e cuja atividade *in vitro*, utilizando os ensaios convencionais, já estão descritos. Este ensaio, sendo realizado em um diferente contexto, foi realizado com a utilização de leucócitos provenientes de doadores saudáveis, sendo infectados com formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* em um contexto *in vitro* de cultura de sangue total. Esta estratégia permitiu assim um acesso à um importante parâmetro dos quimioterápicos: a imunotoxicidade. Ainda, foi possível no presente projeto a quantificação da interação entre parasitos com monócitos e neutrófilos, bem como quantificar citocinas intracelulares, mostrando assim o potencial multiparamétrico do ensaio dentro deste contexto.

A quantificação por microscopia, na qual é realizada a contagem de parasitos por campo em lâminas fixadas é conhecida como método de Brener (Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Ambrozini *et al.*, 2004). Este método é altamente subjetivo, pois depende da leitura de cada operador, podendo incorrer em erros e uma sub ou superestimação do efeito parasitário de determinada amostra. Ademais, é um método cansativo, pouco sensível e específico. Portanto, neste contexto, a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias é comprovado e, a metodologia proposta e padronizada por Bandeira (2013) e aqui validada, torna-se uma ótima opção para a fase pré-clínica preditiva de triagem de compostos com atividade anti-parasitária.

Seguindo o trabalho do mesmo autor, bem como trabalhos anteriores de nosso grupo, os fármacos utilizados como validadores foram escolhidos de acordo com a preconização clínica de terapêutica e reconhecida atividade sobre o parasito. Segundo o Ministério da Saúde (2010), os principais medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses no Brasil são o Antimoniato de metil-N-glucamina (Glucantime®) e a Anfotericina B (Fungizone®). Estes fármacos são usados como controles positivos em ensaios para prospecção de novos fármacos leishmanicidas por meio de metodologias convencionais e foram também utilizados neste ensaio, assim como no ensaio anteriores de padronização e avaliação da aplicabilidade da nova metodologia e comparação com os candidatos a novos fármacos leishmanicidas testados realizado por Bandeira (2013).

Diferentemente das metodologias convencionais, neste trabalho foi possível observar o efeito citotóxico, leishmanicida e de produção de citocinas intracelulares de ambos os fármacos, sendo esta observação simultânea e sujeita as mesmas variações experimentais para todos os

parâmetros. A citotoxicidade foi observada pela avaliação de apoptose tardia e necrose (marcação com 7AAD), e apresentada na Figura 5. A média dos experimentos independentes demonstrou um percentual total de morte de monócitos menor que 20% para Glucantime® e Anfotericina B, enquanto a morte de neutrófilos apresentou-se em valores menores do que 10% para os mesmos fármacos. A habilidade de corantes como 7AAD, iodeto de propídeo, “acridine Orange” e azul de tripan em entrar na célula é dependente da permeabilidade da membrana, já que estes não coram células vivas ou em apoptose precoce devido à membrana plasmática se encontrar ainda intacta (Rieger et al., 2011). Considerando a estratégia de marcação de viabilidade celular escolhida e padronizada por Bandeira (2013), optou-se pelo uso de 7AAD como marcador de viabilidade celular para validação do ensaio, tendo em vista que o iodeto de propídeo possui elevada toxicidade para o operador. Células em apoptose tardia e necróticas apresentam integridade das membranas plasmáticas e nuclear reduzidas, permitindo que este corante atravesse as membranas e intercale dentro do ácido nucléico, levando a emissão de fluorescência passível de ser quantificada por citometria. O uso do 7AAD, permitiu a quantificação de células nestas condições após o tratamento com os fármacos, bem como realizar inferências do potencial citotóxico dos mesmos, mostrando assim sua eficiência e aplicabilidade para estudos de citotoxicidade de potenciais novos protótipos quando se optar pela realização através do ensaio apresentado. Além, corroborou com os estudos realizado pelo mesmo autor, que encontrou baixas toxicidades médias (menores que 20%) na utilização destes dois fármacos na mesma concentração aqui avaliada, sendo então o método validado neste estudo. Outros métodos como o ensaio de MTT para avaliação de viabilidade do PBMC como modelo preditivo de citotoxicidade, possuem limitações. Como nestes ensaios os tipos celulares avaliados incluem linfócitos e monócitos, tem sido descrito que várias substâncias podem apresentar seletividade para as diferentes populações, ou seja, se o fármaco testado for seletivo e induzir toxicidade para monócitos, os linfócitos permanecerão viáveis e a metabolização do MTT ocorrerá podendo, erroneamente, considerar-se que a amostra em teste não é tóxica (Souza-Fagundes et al., 2003; Schdmit et al., 1999). Por outro lado, o uso de sangue periférico avaliado por citometria de fluxo (com marcação de superfície das subpopulações de interesse) e na presença do corante 7AAD, a análise de citotoxicidade pode ser extrapolada para todas as subpopulações celulares existentes simultaneamente e de forma mais acurada.

Neste contexto, esta inovação metodológica apresenta-se como uma ótima alternativa em ensaios confirmatórios para seleção de amostras mais promissoras, identificadas em programas de prospecção de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses e outras doenças negligenciadas como a doença de Chagas, ao qual foi realizado também recente estudo

de padronização da metodologia para prospecção de fármacos com atividade tripanossomicida por nosso grupo (dados não publicados).

Como proposto no estudo, o presente ensaio possui como um de seus parâmetros, em um contexto de descoberta de fármacos com atividade leishmanicida, a possibilidade de quantificação da interação (e internalização) das formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, que, ao serem internalizadas, sofrem diferenciação para a forma amastigota. Além disto, um importante parâmetro – a capacidade leishmanicida dos fármacos – é avaliada de acordo com a quantificação da redução desta interação através da citometria de fluxo. Com este propósito, e, sabendo que a citometria de fluxo é uma técnica baseada em quantificação por excitação da luz (a partir do emprego de fluorocromos), objetivou-se comprovar que, dentro do ensaio, há efetivamente a internalização do parasito. Bandeira (2013), ao padronizar este ensaio e através de observação por microscopia confocal, mostrou que existia a sobreposição nas imagens das marcações realizadas com os fluorocromos utilizados, apontando assim para a possível existência de internalização dos parasitos. De fato, no presente estudo, ficou evidenciado a presença intracelular do parasito, de acordo com as imagens (Figuras 9 e 10), empregando-se diferentes técnicas microscópicas (microscopia óptica e Confocal com marcação nuclear por DAPI). Deste modo, foi possível a visualização da existência de material extranuclear em monócitos e neutrófilos, observados nas lâminas provenientes de culturas que estavam sob a presença do parasito (NT), material este que não era visto nas imagens referentes às culturas contendo apenas células (CC) (Figuras 9 e 10) (Guerra Pinto *et al*, 2016). Ainda, possível uma reconstituição em 3D das imagens obtidas de microscopia confocal com marcação nuclear (Figura 10), que evidenciou a marcação de um núcleo bem próximo ao núcleo dos leucócitos observados, sugerindo assim a presença de formas amastigotas de *L. braziliensis* internalizadas. Todos estes fatos colaboram para a confirmação de que, no presente ensaio, os dados relativos à quantificação da interação leucócitos-*Leishmania*, realmente incluem a internalização do parasito.

No presente estudo, pode também ser observada a redução da interação entre monócitos e neutrófilos com o parasito na presença de Glucantime® e Anfotericina B, comparadas com a condição não tratada (NT), na qual havia a presença de solvente ao invés do fármaco, estando também em concordância com os dados apresentados por Bandeira (2013). No estudo anterior, Bandeira (2013) encontrou redução expressiva da interação entre monócitos e parasito cultivados nas mesmas condições do presente estudo. A redução da interação observada pode então indicar um efeito direto sobre o parasito e/ou ativação celular, resultando na indução de mecanismos microbiocidas de monócitos e subsequente controle do parasitismo. No presente

estudo, houve a necessidade de se ampliar os estudos de modo a avaliar mais detalhadamente os aspectos funcionais dos fagócitos através da posterior análise de citocinas intracelulares, fato este que permitiria avaliar, além do efeito do tratamento, a indução de ativação celular como elementos-chave do controle do parasitismo por *L. braziliensis*.

Para sobreviver dentro dos monócitos, é sabido que a *Leishmania* spp. necessita ser internalizada, porém, a partir do momento que o indivíduo se torna imunocompetente, os parasitos fagocitados são destruídos rapidamente devido à ativação eficaz (através da produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio) das células infectadas (Souza *et al.*, 2012; Gollob *et al.*, 2015). A redução na internalização dos parasitos pelos monócitos e pelos neutrófilos relatadas neste estudo, torna possível lançar a hipótese de que estes fagócitos possam estar funcionalmente ativados de modo a contribuir para o “clearance” do parasito. A própria atividade dos fármacos utilizados neste estudo, aliado à não observação de diferenças estatisticamente significantes para produção de citocinas intracelulares pró-inflamatórias, poderia sugerir que a redução da interação monócito e neutrófilo-*Leishmania* se dá pela própria atuação do fármaco, tendo em vista que são amplamente utilizados na clínica para abordagem terapêutica da doença e possuem reconhecida atividade sobre o parasito. Podemos citar o exemplo do Glucantime®, um quimioterápico a base de antimonial pentavalente e, que após adentrar as células parasitadas (no caso os macrófagos), sofre redução para sua forma trivalente ativa (Berman (1988); MS (2007); Guido & Oliva (2010); Menezes *et al.*, 2015), podendo assim explicar esta diminuição na observação da interação entre monócitos e neutrófilos-parasito, justamente por estar atuando sobre o parasito levando-o a morte e, sem especificamente estar atuando sobre os mesmos tipos celulares ativando-os, na concentração avaliada no trabalho.

Buscando ampliar a análise funcional dos fagócitos alvos da *L. braziliensis*, o presente estudo propôs a análise do perfil de citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladoras. Neste sentido, destaca-se que o TNF- α é uma citocina fundamental na defesa contra patógenos intracelulares e os macrófagos são a principal fonte de produção (Bazzoni & Beutler, 1996; Körner & Sedgwick, 1996; Körner *et al.*, 2010). Na LC, alguns autores já demonstraram que a ação conjunta de IFN- γ e TNF- α induzindo a produção de NO pela ativação da enzima iNOS, o que leva a destruição da *Leishmania* spp. (Green *et al.*, 1990; Stenger *et al.*, 1994; Qadoumi *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2003; Horta *et al.*, 2012). Giudice *et al.* (2012) mostraram que macrófagos infectados por *L. braziliensis*, de pacientes portadores de LC e LM, produziram mais TNF- α , que macrófagos de pacientes considerados assintomáticos ou subclínicos. No presente estudo, as culturas de sangue total provenientes de doadores e infectadas com *L. braziliensis*, que estavam na presença do solvente (NT), não apresentaram diferença quanto a

produção desta citocina quando tratadas com Glucantime® e Anfotericina B (Figuras 7 e 8). Desta forma, os dados diferiram daqueles apresentados por Assis Souza *et al.* (2013), que pode ser explicado por estes autores terem utilizado culturas de sangue provenientes de pacientes que possuíam infecção ativa por LT em comparação com pacientes avaliados após 12 meses de término do tratamento, e não com culturas de sangue total com células proveniente de doadores saudáveis e infectadas com *Leishmania*. Além disto, neste estudo o tempo de cultura foi de apenas de 6 horas, não havendo assim estímulo para produção de citocinas em escala temporal semelhante ao observado no presente estudo, resultando em menor produção de TNF- α em comparação as condições citadas. No presente estudo, pode-se observar ainda que a presença de formas promastigotas de *L. braziliensis*, induz um aumento no percentual de monócitos e neutrófilos TNF- α^+ no grupo tratado com Anfotericina B em relação a condição controle (CC). Espera-se que, após o tratamento específico, os pacientes tornem-se capazes de montar uma resposta imune mais eficaz, ou seja, após estímulo com promastigotas de *L. braziliensis*, estes apresentem uma maior porcentagem de produção de TNF- α , citocina essencial para o combate ao parasito (na presença ou ausência dos fármacos utilizados). Este resultado sugere que os processos decorrentes da interação *Leishmania*-monócito e *Leishmania*-Neutrófilo, são indispensáveis para a produção desta citocina.

Ainda dentre as citocinas pró-inflamatórias, sabe-se que a IL-12 é produzida por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Watford *et al.*, 2003), e que tem importância no direcionamento da resposta imune do tipo 1, uma vez que promove estimulação dos linfócitos T e a produção de IFN- γ , desencadeando o processo de ativação de macrófagos e eliminação do parasito. No presente estudo, foi observado, em grupos estimulados (NT, Glucantime® e Anfotericina B) um maior percentual de monócitos IL-12⁺ em comparação à culturas controle de células (CC) para as duas subpopulações avaliadas. Por outro lado, não foi possível observar que a presença dos fármacos juntamente com as culturas contendo células e parasitos, potencializa a produção de IL-12, pois não houve diferença no percentual de monócitos e neutrófilos IL-12⁺ em culturas com promastigotas de *L. braziliensis*, em relação às que receberam tratamento com os dois fármacos. O aumento da produção desta citocina, em culturas com formas vivas de promastigotas de *L. braziliensis* associadas aos fármacos, demonstra sua participação na indução desta importante citocina pró-inflamatória para controlar do parasitismo por *L. braziliensis*. Neste sentido, estudos realizados em pacientes curados para LT, após o tratamento específico, demonstraram capacidade em desencadear resposta eficaz e efetiva contra o parasito, o que pode ser explicado pelo contato anterior com o parasito e memória imunológica desenvolvida. Assim, a presença de TNF- α e IL-12 em indivíduos

curados, mostra que essas citocinas poderiam estar envolvidas na manutenção da cura clínica desses pacientes, evitando reativação da doença (Alves, 2014).

Destaca-se ainda, no contexto da resposta imune às leishmanioses, as citocinas moduladoras IL-10 e TGF- β . Macrófagos, células dendríticas, células T reguladoras, entre outras células, podem contribuir para produção de IL-10 nas leishmanioses (Campanelli *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2012). É sabido que na LV, a IL-10 e TGF- β modulam a resposta Tipo 1 e reduzem a proliferação linfocitária, além da produção de IFN- γ (Carvalho *et al.*, 1994a; Nylen & Sacks, 2007). No caso da LC, a presença da IL-10 juntamente com citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e o IFN- γ estão relacionadas à resolução da doença, sugerindo que a presença da IL-10 é um fator regulador da liberação principalmente de TNF- α nos macrófagos e monócitos do hospedeiro (Gollob *et al.*, 2015). Alguns autores mostraram que IL-10 favorece o crescimento parasitário na fase inicial da doença, o que contribui para o estabelecimento e manutenção da infecção (Chatelain, Mauze & Coffman, 1999; Salhi *et al.*, 2008; Castellano *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012). De Assis Souza *et al.*, (2013), demonstraram maior produção de IL-10 em pacientes com LT ativa quando comparado aos mesmos pacientes curados, avaliados 12 meses após o término do tratamento. De-Campos *et al.* (2010), sugeriram que IL-10 poderia desativar células apresentadoras de antígenos infectadas, e que estas deixariam de responder ao estímulo de IFN- γ . Desta forma, o presente trabalho demonstrou maior percentual de monócitos IL-10⁺ em culturas que possuíam as formas vivas de promastigotas de *L. braziliensis* quando comparadas às culturas que não continham o parasito. Porém, ao se comparar apenas as culturas que possuíam o parasito, ou seja, as condições não tratadas com as com as condições que receberam tratamento com Glucantime® e Anfotericina B, para monócitos e neutrófilos, não foi observada diferença estatística quanto a porcentagem de células positivas para esta citocina. Belkaid *et al.* (2002), sugerem que a presença de *L. braziliensis* estimula a produção de IL-10, ou seja, que estas citocinas estão envolvidas nos processos que levam ao estabelecimento da doença. Alguns estudos demonstraram que pacientes com alta expressão intralesional de IL-10 durante a fase inicial da infecção por *L. guyanensis*, não apresentaram resposta eficiente ao tratamento com isotionato de pentamidina (Bourreau *et al.*, 2001). Os autores sugerem que IL-10 pode prejudicar a resposta ao tratamento por inibir a síntese de citocinas do Tipo 1, como IL-12 e IFN- γ , e/ou a maturação de células dendríticas que são essenciais para a efetividade da resposta imune. Os dados obtidos neste estudo sugerem que pode haver uma concordância com os achados referentes à infecção por *L. guyanensis*, uma vez que, existe uma tendência ao aumento de produção desta citocina em culturas de sangue total

infectadas com as formas promastigotas vivas do parasito, mesmo na presença da Anfotericina B, como visto para monócitos.

Alves (2014), demonstrou em culturas com formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* de pacientes com LCL, um padrão de perfil imune modulado com aumento do percentual de monócitos IL-10⁺, associado à queda do percentual de monócitos TNF- α ⁺, IL-12⁺. Assim, a presença de citocinas moduladoras na LCL pode ser responsável pela manutenção da lesão. Embora não tenha sido possível se obter diferenças estatísticas quanto ao perfil de citocinas intracelulares produzidas quando comparamos o resultados das culturas que tinham a presença da forma promastigota viva do parasito (NT, Glucantime® e Anfotericina B), sabe-se a diminuição do percentual de células IL-10⁺ e aumento das TNF- α ⁺ e IL-12⁺ contribui para o controle do parasitismo e melhora clínica da doença, como mostrado em vários estudos onde foram avaliadas produção de citocinas intracelulares de culturas provenientes do sangue de pacientes após o tratamento, como os estudos realizados por Assis Souza *et al.* (2013), que demonstraram menor produção de TNF- α em culturas de sangue total de pacientes com LT ativa quando comparado aos pacientes avaliados após 12 meses do término do tratamento. Neste estudo, foi demonstrado ainda que a presença de formas promastigotas de *L. braziliensis* induziu aumento no percentual de monócitos TNF- α ⁺ no grupo dos pacientes curados avaliados 90 dias após tratamento (Assis Souza *et al.*, 2013). Após o tratamento específico, os pacientes tornam-se capazes de montar uma resposta imune mais eficaz, desta forma, após estímulo com promastigotas *L. braziliensis*, estes apresentam maior frequência de produção de TNF- α , que é uma citocina essencial para o combate ao parasito (Bazzoni & Beutler, 1996; Körner & Sedgwick, 1996; Körner *et al.*, 2010).

Como o objetivo do tratamento visa a redução do parasitismo, sem induzir citotoxicidade inespecífica, favorecendo o estabelecimento de uma resposta imune protetora, os parâmetros ideais que poderiam estar presentes em ensaios de atividade anti-parasitária para identificar drogas/fármacos promissores, seriam: (i) apresentar redução no percentual da interação do parasito com monócitos e neutrófilos (atividade leishmanicida); associado a (ii) baixa porcentagem (até 20%) monócitos e neutrófilos 7AAD⁺ (indicando baixa citotoxicidade induzida pelo fármaco); além de (iii) apresentar redução no percentual de células IL-10⁺; com consequente (iv) aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α ⁺, IL-12⁺). Neste estudo de validação com fármacos utilizados amplamente na clínica, foi possível acessar todos estes parâmetros, excetuando-se diferenças estatísticas para a produção de citocinas intracelulares. Como adendo à este estudo, propomos que, em experimentos futuros, seja respeitado um tempo

minímo de quatro horas para interação entre os leucócitos com as promastigotas de *L. braziliensis*, seguindo assim adição dos fármacos (ou dos protótipos a serem testados), o que pode permitir uma melhor resposta quanto à avaliação da produção de citocinas intracelulares. Outro fator interessante a ser considerado, é a necessidade da descoberta de protótipos que possam vir a influenciar este parâmetro, não obtendo apenas ação direta sobre o parasito, mas também estimulando as células a estabelecerem uma resposta imune protetora contra a doença.

Desta forma, podemos destacar o grande potencial do ensaio proposto com vistas à descoberta de novos protótipos com atividade leishmanicida, pois este demonstrou grande eficiência para a quantificação de todos os importantes parâmetros que uma substância promissora deve possuir no contexto de doenças parasitárias negligenciadas. Além disto, demonstrou ter a capacidade de avaliação do impacto dos fármacos sobre as culturas de sangue total, simulando o potencial imunotóxico de uma possível administração endovenosa no momento de sua administração, característica do tratamento para leishmaniose. Por último, pôde também ser demonstrada a eficácia do novo ensaio para as fases pré-clínicas preditivas no contexto da descoberta de fármacos. Este fato, quando consideramos a maior complexidade do ensaio proposto, demonstra sua potencial aplicabilidade na substituição de ensaios convencionais, bem como uma nova alternativa para a diminuição da utilização de animais para experimentação nestas fases do processo.

7. CONCLUSÃO

Foi possível aprimorar o novo ensaio funcional pré-clínico multiparamétrico baseado em citometria de fluxo, ao qual adicionou-se um novo parâmetro – a capacidade de predição da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano. Como foram utilizados fármacos que consistem nas principais indicações terapêuticas contra as leishmanioses, foi possível aumentar a acurácia da metodologia, indicando que este sistema de triagem de candidatos terapêuticos foi capaz de corroborar o baixo efeito citotóxico do Glucantime® e Anfotericina B, aliado a pronunciada redução do parasitismo por formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* em monócitos e neutrófilos. Além disto, este sistema de análise *in vitro* foi capaz de detectar citocinas intracelulares (IL-10, TNF- α , IL-12) em monócitos e neutrófilos, relacionadas diretamente a resistência ou susceptibilidade a infecção por *Leishmania*.

O novo ensaio apresenta-se como uma nova alternativa na área de descoberta de fármacos, permitindo predição acurada da atividade de novas substâncias com atividade leishmanicida nas fases pré-clínicas de estudo. Ainda, pode ser considerada uma alternativa à diminuição da utilização de modelos com animais nesta etapa.

8. PERSPECTIVAS

Novos estudos podem ser executados na tentativa acrescentar novas informações ao presente ensaio. Dentro destas perspectivas, incluímos uma proposta de avaliação de diferentes tempos de adição dos fármacos e/ou protótipos a serem testados, de modo a possibilitar uma interação entre fagócitos-*Leishmania* prévia. Tal medida é essencial para que possamos compreender melhor os mecanismos envolvidos na eliminação do parasito, sejam eles pela ação direta do fármaco, ativação das células alvo do parasito (e conseqüente eliminação deste) ou ambos.

Outra proposta de inclusão refere-se ao estudo da produção de citocinas intracelulares por culturas contendo os leucócitos na mesma proporção padronizada e droga, que permitiria avaliar diretamente se o fármaco possui capacidade de ativar as células alvo do parasitismo (monócitos e neutrófilos) diretamente, através do perfil de produção de citocinas intracelulares.

Por último e como uma expansão do estudo, sugere-se que as culturas de sangue total, após o período de incubação padronizado de seis horas, passem por procedimento de centrifugação com retirada do sobrenadante após os tubos serem vertidos e adição de um meio de cultura rico (como o CM Blast, por exemplo), seguido de re-incubação por mais dez horas (totalizando assim 16 horas de incubação). Este fato permitira a extrapolação das análises para um perfil de resposta adaptativo e conseqüente avaliação das subpopulações de linfócitos ($TC4^{+}$, $TC8^{+}$, Linfócitos B, NK etc), que são sabidamente subpopulações diretamente envolvidas na imunopatologia da leishmaniose. O estudo destas subpopulações poderia também fornecer novas alternativas de avaliação para futuros protótipos promissores.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE A, CABRERA E, CERECETTO H, DI MAIO R, GONZÁLEZ M, SEOANE G, DUFFAUT A, DENICOLA A, GIL MJ, MARTINEZ-MERINO V. Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39 (5), 421-431; 2004.

ALVES, M.L.R. Avaliação do perfil fenotípico-funcional de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, tratados com o antimoniato de N-metil glucamina. *Dissertação (Mestrado em Biologia Celular na área de concentração em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte*, 2014. Acessado em março de 2016.

ANTAL-SZALMAS, P., STRIJP, J. A., WEERSINK, A. J., VERHOEF, J., VAN KESSEL, K.P. 1997. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 61:721–728.

AMBROZIN ARP, LEITE AC, SILVA M, VIEIRA PC, FERNANDES JB, THIEMANN OH, DA SILVA MFGF, OLIVA G. Screening of Leishmania APRT enzyme inhibitors. *Pharmazie* 60: 781-784; 2005b.

AMBROZIN ARP, VIEIRA PC, FERNANDES JB, DA SILVA M, DE ALBUQUERQUE S. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 227-231; 2004.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin and Exp Dermatol*. 2010; 35: 699-705.

ASHFORD D. Características clínicas e demográficas da leishmaniose visceral canina em Jacobina - Bahia. *An Congr Bras Med Trop, Belém* 82: 1992.

AZEREDO-COUTINHO RB, MENDONÇA SC, CALLAHAN H, PORTAL AC, MAX G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol* 93:688-693; 2007.

AWASTHI, A; MATHUR, RK; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J of Medical Research*. 2004; 119: 238-258.

BACHA, HA; TUON, FF; ZAMPIERI, RA; FLOETER-WINTER, LM; OLIVEIRA, J; NICODEMO, AC; QUIROGA, MM; MASCHERETTI, M; BOULOS, M; AMATO, VS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011; 105: 173-178.

BALANÑA-FOUCE R, REGUERA RM, CUBRÍA C, ORDÓÑEZ D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol*. 30:435-43; 1998.

BANDEIRA, C. C. Padronização de ensaio funcional pré-clínico multiparamétrico *in vitro* por citometria de fluxo para avaliar potenciais atividades leishmanicida e citotóxica de substâncias puras e produtos naturais. *Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Biofarmacêutica)* – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, 2013. Acessado em fevereiro de 2016.

BARATTA-MASINI, A; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MALAQUIAS, LC; MAYRINK, W; MARTINS-FILHO, OA; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci*. 2007; 12: 839-849.

BARROSO, P.A., MARCO, J.D., CALVOPINA, M., KATO, H., KORENAGA, M., HASHIGUCHI, Y. A trial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1123–1129; 2007.

BARRAL, A; SAMPAIO, DP; GRIMALDI JR, G; MOMEM, H; PRATT; DMM; JESUS, AR; ALMEIDA, R; BADARÓ, R; NETTO, MB; CARVALHO, EM; JONHSON JR, WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil, Evidence that *Leishmania amazonenses* produces a wide spectrum of clinical diseases. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 536-546; 1991.

BAZZONI, F; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1717-1725. Review.

BELKAID, Y; BUTCHER, B; SACKS, DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 1389-1400.

BELKAID, Y; PICCIRILLO, CA; MENDEZ, S; SHEVACH, EM; SACKS, DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420: 502-507.

BERG, K., ZHAI, L., CHEN, M., KHARAZMI, A., OWEN, T.C. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitol Res.* 1994. 80:235-239.

BERMAN JD, HANSON WL, CHAPMAN WL, ALVING CR, LOPEZ-BERESTEIN G. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 30:847-51; 1986.

BERMAN, JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Inf. Dis.* 1988; 10: 560-586.

BEYRER C, VILLAR JC, SUWANVANICHKIJ V, SINGH S, BARAL SD, MILLS EJ. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet* 370:619–627; 2007.

BHANUSHALI M., BAGALE V., SHIRODE A., JOSHI Y., KADAM V. An in-vitro toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 1 15-31; 2010.

BODLEY AL, MCGARRY MW, SHAPIRO TA. Drug toxicity assay for African trypanosomes and Leishmania species. *J Infectious Diseases* 172(4): 1157-9; 1995.

BOYD, M.R. The NCI *in vitro* anticancer drug discovery screen: Concept, implementation, and operation, 1985-1995. From: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. Edited by: B. Teicher Humana Press Inc., Totowa, NJ. Disponível em <http://home.ncifcrf.gov/mtdp/catalog/full_text/paper309/Paper309.pdf> Acessado em 22 de Janeiro de 2016.

BOURREAU, E; PRÉVOT, G; GARDON, J; PRADINAUD, R; LAUNOIS, P. High intralésional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1628-1630.

BOLZANI, V.S. Biodiversidade e bioprospecção como estratégias para a descoberta de drogas a partir de plantas e fungos endofíticos – a experiência do Biota-FAPES. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. *Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 1 a 3 de dezembro de 2004.*

BRAGA FG, BOUZADA ML, FABRI RL, DE O MATOS M, MOREIRA FO, SCIO E, COIMBRA ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol* 4:111(2):396-402; 2007.

BRASIL, Portaria nº 3.196, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. *Diário Oficial da União. Brasília-DF, out. 1998.*

BRENDLE, JJ; OUTLAW A; KUMAR, A; BOYKIN, DW; PATRICK, DA; TIDWELL, RR; WERBOVETZ, KA. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 797-807; 2002.

BRELAZ, MC; DE OLIVEIRA, AP; DE ALMEIDA, AF; DE ASSIS SOUZA, M; MEDEIROS, ÂC; DE BRITO, ME; PEREIRA, VR. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 236-239.

BRELAZ-DE-CASTRO, MC; DE ALMEIDA, AF; DE OLIVEIRA, AP, *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patient's cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol.* 2012; 279:180-186.

BUCKNER FS, VERLINDE CL, LA FLAMME AC, VAN VOORHIS. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 40: No. 11; pp: 2592-2597; 1996.

BUKNER F, WILSON AJ. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* Amastigotes grown in macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(5): pp. 600-605; 2005.

CAMARA COELHO, LI; PAES, M; GUERRA, JA; BARBOSA, MD; COELHO, C; LIMA, B; BRITO, ME; BRANDÃO FILHO, SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* 2011; 108: 671-677.

CUNNINGHAM, AC. Parasite adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp and Mol Pathol.* 2002; 72: 132-141.

CAMPANELLI, AP; ROSELINO, AM; CAVASSANI, KA, *et al.* CD4+CD25+ T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. *J of Infect Diseases.* 2006; 193: 1313-1322.

CARFI, M., GENNARI, A., MALERBA, I., CORSINI, E., PALLARDY, M., PIETERS, R., VAN LOVEREN, H., VOHR, H.W., HARTUNG, T., GRIBALDO, L. *In vitro* tests to evaluate immunotoxicity: A preliminary study. *Toxicology.* 2007; 229: 11-22.

CARVALHO, EM; BACELLAR, O; BROWNELL, C; REGIS, T; COFFMAN, RL; REED, SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1994; 152: 5949-5956.

CARVALHO, LP; PASSOS, S; SCHRIEFER, A; CARVALHO, EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012; 3: 301.

CASTELLANO, LR; FILHO, DC; ARGIRO, L; DESSEIN, H; PRATA, A; DESSEIN, A; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Human Immunol.* 2009; 70: 383-390.

CHANCE, M.L. The biochemical and immunological taxonomy of Leishmania. In: Leishmaniasis (K.-E Chang and R.S. Bray, eds), *Amsterdam: Elsevier pp. 93-110; 1985.*

CHATELAIN, R; MAUZE, S; COFFMAN, RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* 1999a; 21: 211-218.

CODER, MD., Current Protocols in Cytometry,: Assessment of Viability, Immunofluorescence, and DNA Content; *John Wiley and Sons, Inc.* Unit 9.2; 9.2.1-9.2.14; 1997.

COUTINHO, SG; DA-CRUZ, AM; BERTHO, AL; SANTIAGO, MA; DE-LUCA, P; Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31: 139-142.

CUNNINGHAM, AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp and Mol Pathol.* 2002; 72: 132-141.

DA-CRUZ, AM; CONCEIÇÃO-SILVA, F; BERTHO, AL; COUTINHO, SG. Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994. 62: 2614-2618.

DALANHOL, M., BARROS, M., MAZUCHELLI, J., SILVA, P.H., HASHIMOTO, Y., LARGURA, A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* vol.32 no.1 São Paulo Feb Epub Mar 19; 2010.

DAUSSET J., CONTU L. Drug-Induced Hemolysis. *Annual Review of Medicine.* Vol. 18: 55; 1967.

DAVID, CV; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol and Therapy.* 2009; 22: 491-502

DE ASSIS SOUZA, M; BRELAZ-DE-CASTRO, MCA; OLIVEIRA, AP; DE ALMEIDA, AF; DE ALMEIDA, TM; REIS, LC; MEDEIROS, ACR; DE BRITO, MEF; PEREIRA, VRA. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microbial Pathogenesis.* 2013; 57: 27-32.

DE-CAMPOS, SN; SOUZA-LEMOS, C; TEVA, A; PORROZZI, R; GRIMALDI, G JR. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 137: 149-154.

DE SOUZA LEO, S; LANG, T; PRINA, E; HELLIO, R; ANTOINE, JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J of Cell Science.* 1995; 108: 3219-31.

DIAS, J.C.P., Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* vol.104, suppl.1, pp. 41-45; 2009.

DÍAZ, NL; FERNÁNDEZ, M; FIGUEIRA, E; RAMÍREZ, R; MONSALVE, IB; TAPIA, FJ. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28: 288-293.

DI GIORGIO C, RIDOUX O, DELMAS F, AZAS N, GASQUET M, TIMON-DAVID P. Flow cytometric detection of Leishmania parasites in human monocyte-derived macrophages: application to antileishmanial-drug testing. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov; 44(11):3074-8; 2000.

DI GIORGIO C., RIDOUX O., DELMAS F., AZAS N., GASQUET M., AND TIMON-DAVID CARFI M P., GENNARI A , MALERBA I, CORSINI E, PALLARDY M, PIETERS R. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: A preliminary study. *Toxicology*, 229, 11–22; 2007.

DONKOR, IO; ASSEFA H; RATTENDI, D; LANNE, S; VARGAS, M; GOLDBERG, B; BACCHI, C. Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidina. *European Journal Med. Chem.*, v. 36, p 531-538; 2001.

FALCONNET D., CSUCS G., GRANDIN H.M., TEXTO, M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays - Review Article. *Biomaterials*, Volume 27, Issue 16, Pages 3044-3063, June; 2006.

FERNÁNDEZ FREIRE P., LABRADOR V., PÉREZ MARTÍN J.M., HAZEN M.J. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology* 210: 37–4; 2005.

FOLLADOR, I; ARAUJO, C; BACELLAR, O, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of Leishmania braziliensis infection. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 54-58.

FOUCHET, P., C. JAYAT, Y. HECHARD, M. H. RATINAUD, G. FRELAT. 1993. Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. *Biology of the Cell* Volume 78, Issue 1-2, pages 95–109; 1993.

FREITAS-TEIXEIRA, PM; SILVEIRA-LEMOS, D; GIUNCHETTI, RC, *et al.* Distinct pattern of immunophenotypic features of innate and adaptive immunity as a putative signature of clinical and laboratorial status of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.* 2012; 76(4):421-432.

FUMAROLA L, SPINELLI R, BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res in Microbiol* 155: 224-230; 2004.

GARRATT, G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Reviews* 24: 143–150; 2010.

GIUDICE, A., VENDRAME, C., BEZERRA, C., CARVALHO, L.P., *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* 2012; 29: 12.

GOLLOB, K.J., VIANA, A.G., DUTRA, W.O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite Immunology.* 2015. 36(8):367-376,

GOMES JA, CAMPI-AZEVEDO AC, TEIXEIRA-CARVALHO A, SILVEIRA-LEMOS D, VITELLI-AVELAR D, SATHLER-AVELAR R, PERUHYPE-MAGALHÃES V, SILVESTRE KF, BATISTA MA, SCHACHNIK NC, CORREA-OLIVEIRA R, ELOI-SANTOS S, MARTINS-FILHO OA. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology.* Oct;217(10):1005-16; 2012 ; Epub: Jan 20; 2012.

GONTIJO, CMF; DA SILVA, ES; DE FUCCIO, MB; DE SOUSA, MCA; PACHECO, RS; DIAS, ES; ANDRADE-FILHO, JD; BRAZIL, RP; MELO, MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2002; 81: 143-150.

GUERRA PINTO, J., PEREIRA, A.H.C., OLIVEIRA, M.A., KURACHI, C., RANIERO, L.J., STRIXINO, J.F. Chlorin E6 phototoxicity in *L. major* and *L. braziliensis* promastigotes – *in vitro* studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016. S1572-1000(16)30043-6.

GUIMARÃES, L.H., MACHADO, P.R., LAGO, E.L., MORGAN, D.J., SCHRIEFER, A., BACELLAR, O., et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in transmission area of *Leishmania braziliensis* in state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(7):712-715.

GREEN, SJ; CRAWFORD, RM; HOCKMEYER, JT; MELTZER, MS; NACY, CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. 1990; 145: 4290-4297.

GREVELINK, SA; LERNER, EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996; 34: 257-272. Review.

GRIMALDI JR, G; TESH, RB & MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *American J of Trop Med and Hyg*. 1989; 41: 687-725.

GUIDO, RAFAEL V. C.; Andricopulo, Adriano D. and Oliva, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. av. vol.24, n.70, pp. 81-98; 2010.*

GUTIERREZ, Y; SALINAS, GH; PALMA, G; VALDERRAMA, LB; SANTRICH, CV; SARAVIA, NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *American J Trop Med Hyg*. 1991; 45: 281-289.

HERWALDT, BL; BERMAN, JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *American J Trop Med Hyg*. 1992; 46: 296-306.

HODGE G., HODGE S., HAN P. Leukocyte subsets in cultured pbmcs compared to whole blood as shown by annexin v binding: relevance to cytokine production. *Cytokine*, vol. 12: no. 12; December; pp 1763–1768; 2000.

HORTA, MF; MENDES, BP; ROMA, EH; NORONHA, FS; MACÊDO, JP; OLIVEIRA, LS; DUARTE, MM; VIEIRA, LQ. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 203818.

INOUE A, KODAMA N, NANBA H. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T Lymph Node Th/Th-2 proportion. *Biol Pharm. Bull*, 25(4):536-540; 2002.

JAMES, A. & KAREN, B. T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters* 99: 17–23; 2005.

JONATHAN, F. Tait, 1,2 Christina Smith,¹ and Brent L.Wood. Measurement of Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes and Platelets by Whole-Blood Flow Cytometry with Annexin V. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 25(5) September 15: 271–278;1999.

KAVOOSI, G; ARDESTANI, S; KARIMINIA, A; ABOLHASSANI, M; TURCO, S. Leishmania major: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. *Exp Parasitol.* 2006; 114 (4): 323-328.

KAVOOSI, G; ARDESTANI, SK; KARIMINIA, A; ALIMOHAMMADIAN, MH. *Leishmania major* lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. *Exp Parasitol.* 2010; 124: 214-218.

KAWA, H; SABROZA, PC; OLIVEIRA, RM; BARCELLOS, C. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Publica.* 2010; 26: 1495-1507.

KEESEN, TSL; ANTONELLI, LRV; FARIA, DR; GUIMARÃES, LH; BACELLAR, O; CARVALHO, EM; DUTRA, WO; GOLLOB, KJ. CD4+ T cells defined by their V β T cell

receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin and Exp Immunol.* 2011; 165: 338–351.

KÖRNER, H; MCMORRAN, B; SCHLÜTER, D; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol.* 2010; 40: 879-888. Review.

KÖRNER, H; SEDGWICK, JD. Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol Cell Biol.* 1996; 74: 465-472. Review.

KURT-JONES, E. A., MANDELL, L., WHITNEY, C., PADGETT, A., GOSSELIN, K., NEWBURGER, P.E., FINBERG, R.W. 2002. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100:1860–1868.

KRAM D, THALE C, KOLODZIEJ H, KIDERLEN AF. Intracellular parasite kill: flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *J Immunol Methods.* Apr 20; 333(1-2):79-88; 2008.

KRAM, D., THALE, C., KOLODZIEJ, H., KIDERLEN, A.F. Intracellular parasite kill: flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *Journal of Immunological Methods* 333, 79–88; 2008.

LAINSON, R; SHAW, JJ. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis. *Academic Press Inc.* 1987; 1-20.

LANGEZAAL I, COECKE S, HARTUNG T. Whole blood cytokine response as a measure of immunotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 15: 313–318; 2001.

LECOEUR, E.L., PRE´VOST, M-C., GOUGEON, M-L. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *Journal of Immunological Methods* 209: 111–12; 1997.

LEE SH, MENG XW, FLATTEN KS, LOEGERING DA, KAUFMANN SH. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ. Jan;20(1):64-76. Epub 2012 Aug 3;2013.*

LOPES MS, DE SOUZA PIETRA RC, BORGATI TF, ROMEIRO CF, JÚNIOR PA, ROMANHA AJ, ALVES RJ, SOUZA-FAGUNDES EM, FERNANDES AP, DE OLIVEIRA RB. Synthesis and evaluation of the anti-parasitic activity of aromatic nitro compounds. *Eur J Med Chem. Nov; 46(11):5443-7; 2011.*

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 104, p. 9375–9380, 2007.*

MAGALHÃES, A.V., MORAES, M., RAICK, A.N. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev do Inst de Med Trop de São Paulo. 1986; 28: 253–62.*

MAGALHÃES-ROCHA N.M., MELO M.N., BABÁ E.H., WILLIAMS P., DIAS M., MICHALICK M.S., COSTA C.A., MARYRINK W., TOVORA P.T.C. Isoenzymatic characterization of *Leishmania* isoletd from human hosts in the Rio Doce Valley, Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz; 82:96 (Resumo); 1987.*

MARZOCHI M.C.A., MARSDEN P.P. Ecologia e Controle de Vetores - Leishmanioses. *In: Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz), Rio de Janeiro, p. 31-36; 1991.*

MARZOCHI, M.C.A. & MARZOCHI, K.B.F. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. *Rev da Soc Brasileira de Med Trop. 1994; 27 (supl. 1): 91.*

MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública* 10: 359-375; 1994.

MAURICIO, I.L., STOTHARD J.R., MILES M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189; 2000.

MENEZES, J.P.B., GUEDES, C.E.S., PETERSEN, A.L.O.A., FRAGA, D.B.M.F., VERAS, P.S.T. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. *BioMed Res Int.* 2015. 34(8):1-11.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Diagnóstico Clínico e diferencial, primeira edição. Brasília-DF, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, segunda edição. Brasília-DF, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em <<http://dtr2014.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 20 de março de 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. Leishmaniose Tegumentar Americana - Manual de Vigilância do Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 2. ed. atual. – Brasília.

MIRANDA, C.G., SOLANA, M. E., CURTO, M. A., LAMMEL, E. M., SCHIJMAN, A. G., SOTO, C. D. A. A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 2015; 152:8-16.

MORAIS-TEIXEIRA, E., CARVALHO, A.S., DA COSTA, J.C.S., DUARTE, S.L., MENDONÇA, J.S, BOECHAT, N., RABELLO, A. In vitro and in vivo activity of meglumine

antimoniato produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L (L.) chagasi* and *L (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 103(4): 358-362; June 2008.

MOSSER, DM; ROSENTHAL, LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cel Biol.* 1993; 4: 315-22.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J.J.; MARTINEZ-DÍAZ, R.A.; ESCARIO, J.A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, J.R.; GÓMEZ-BARRIO, A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 71, p. 101-107; 2000.

MUKUL, K.M., SMITA, M., MOHAMMAD, O., NEENA, G. Expression, purification, and characterization of *Leishmania donovani* trypanothione reductase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 40: Issue 2, 279-286; 2005.

MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar): a decade of progress and future approach. *Int. J. Infec. Dis.*, v. 4, n. 3, p. 158-177; 2000.

MUSKUS, C.C., MARÍN VILLA, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica.* 2002. 22(2): 167-177

NAME, R.Q., BORGES, K.T., NOGUEIRA, L.C., SAMPAIO, J.H.D., TAUIL, P.L. SAMPAIO, R.N.R. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. *An. Bras. Dermatol.* 80 (3): 249-54; 2005.

NEELOO S., ANURADHA D. Fluorescent leishmania: application to anti-leishmanial drug testing *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(4): pp. 400-402; 2004.

NHAKA, S., HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Rev Drug Disc.* 2006. 5: 941-955.

NHAKA, S., RAMIREZ, B., BRUN, R., MAES, L., DOUGLAS, F., RIDLEY, R. Advancing drug innovation for neglected diseases – criteria for lead progression. *Plos Negl Trop Dise.* 2009. 3(8): e440.

NYLÉN, S; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007; 28: 378-384. Review.

OLIVEIRA, MC; AMORIM, RF; FREITAS, RDEA; COSTA, ADEL. A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 258-60.

OLIVEIRA-NETO MP, PIRMEZ C, RANGEL E, SCHUBACH A, GRIMALDI JUNIOR G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz, out-dez;* 83 (4): 427-35; 1988.

OLIVEIRA-NETO, MP; MATTOS, M; PIRMEZ C, *et al.* Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime®) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000; 42: 321-5.

OLIVEIRA-SILVA, F., MORAIS-TEIXEIRA, E., AND RABELLO, A. Antileishmanial Activity of Azithromycin Against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi* *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(5): pp. 745–749; 2008

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L., ESPADA-FERNÁNDEZ, R., DEA-AYUELA M.A., TORRADO, J.J, BOLÁS-FERNANDEZ, F., ALUNDA, J.M. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30 325–329; 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Epidemiology and control of Leishmaniasis. Technical Report Series. Geneva: WHO; 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Epidemiology and control of Leishmaniasis. Technical Report Series. Geneva: WHO; 2012.

PASSOS, VM; FALCÃO, AL; MARZOCHI, MC; GONTIJO, CM; DIAS, ES; BARBOSA-SANTOS, EG; GUERRA, HL; KATZ, N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 103-110.

PEARSON, RD; SOUSA, AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1996; 22: 1-13. Review.

PETERS, N.C., EGEN, J.G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMAHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M.P., GERMAIN, R.N., SACKS, D., In vitro imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008. 321; 970-974.

PINTO-DA-SILVA, LH; CAMURATE, M; COSTA, KA; OLIVEIRA, SMP; CUNHA-E-SILVA, NL; SARAIVA, EMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International Journal for Parasitology*. 2002; 32: 1371–1377.

PIRMEZ, C; COOPER, C; PAES-OLIVEIRA, M, *et al*. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol*. 1990; 145: 3100–4.

PLOCK, S.H., PRESBER. Application of Flow Cytometry and Microscopical Methods to Characterize the Effect of Herbal Drugs on *Leishmania* Spp. *Experimental Parasitology* 97: 141–153; 2001.

QADOUMI, M; BECKER, I; DONHAUSER, N; RÖLLINGHOFF, M; BOGDAN, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002; 70: 4638-4642.

QUARESMA, PF. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores. *Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias)* - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou - Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/5505>. Acessado em 25 de fevereiro 2016.

RATH S, TRIVELIN LA IMBRUNITO TR, TOMAZELA DM, DE JESÚS, MN, MARZAL PC et al. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quim Nova*. 26:550-5; 2003.

RAVETCH, J; ADEREM, A. Phagocytic cells. *Immunol Rev*. 2007; 219: 5-7.

REBBESTAD, K., HERREDSVELA, S., SORNES, S., EIDE, G. E., MILLER, K. E., SPRIET, E., SJURSEN, H., NAESS. Flow cytometry technique for analysing Leishmania promastigote phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Parasite Immunology*. 34, 528–535; 2012.

REIS, LC; BRITO, MEF; SOUZA, MA; MEDEIROS, ACR; SILVA, CJ; LUNA, CF; PEREIRA, VRA. Cellular Immune Response Profile in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis Prior and Post Chemotherapy Treatment. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2009; 23: 63–69.

RIBEIRO GOMES, F.L., PETTERS, N.C., DEBRABANT, A., SACKS, D.L. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog*. 2012. (8):1-12.

RIEGER AM, NELSON KL, KONOWALCHUK JD, BARREDA DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. Apr 24;(50); 2011.

ROCHA, PN; ALMEIDA, RP; BACELLAR, O, et al. Down-regulation of Th1 type response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1999; 180: 1731-1734.

ROLÓN. M., VEGA, C., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing *Trypanossoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 2006. 99: 103-107.

SACKS, D.L., Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 1989; 69(1):100-103.

SALHI, A; RODRIGUES, V JR; SANTORO, F; DESSEIN, H; ROMANO, A; CASTELLANO, LR; SERTORIO, M; RAFATI, S; CHEVILLARD, C; PRATA, A; ALCAÏS, A; ARGIRO, L; DESSEIN, A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008; 180: 6139-6148.

SAHA, P., MUKHOPADHYAY, D., CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against leishmaniasis. *Int Immunoph.* 2011; 11:1668-1679.

SAMPAIO, RNR; MÉRCHAN, EM; VEXENAT, A.; TRITÃO, RJ; MARSDEN, PD. Combined antimonial allopurinol therapy in mucosal leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 373-374; 1990.

SAMPAIO, RN; DE PAULA, CD; SAMPAIO, JH, et al. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997; 30: 457-63.

SES-MG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>> Acessado em 14 de fevereiro de 2016

SERENO, D., HOLZMULLER, P., MANGOT, I., CUNY, G., OUAÏSSI, A., LEMESRE, J.L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimic Ag and Chemot.* 2001. 45: 2064-2069.

SCHMIDT M, PAUELS H-G, LUGERING N, LUGERING A, DOMSCHKE W, KUCHARZIK T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1Beta. *J Immunol.* 163:3484– 90; 1999.

SHIMABUKURO, PHF; SILVA, TRR; RIBEIRO, FOF; BATON, LA; GALATI, EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.* 2010; 3: 121.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R; CORBETT, CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 239-51.

SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., CORBETT, C.E. Further observations on clinical, histopathological and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(5):525-534.

SINGH, S; SILVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* v. 10, p. 310-315; 2004.

SOTO, J; TOLEDO, J; VEGA, J; BERMAN, J. Short report: efficacy of pentavalent antimony for of colombian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 72, n. 4, p. 421-422; 2005.

SOUZA, MA; CASTRO, MCAB; OLIVEIRA, AP; ALMEIDA, AF; REIS, LC; SILVA, CJ; BRITO, MEF; PEREIRA, VRA. American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. *Scand J of Immunol.* 2012; 175-180.

SOUZA-FAGUNDES E.M, GAZZINELLI G, PARREIRA G.G, MARTINS-FILHO O.A, AMARANTE-MENDES G.P, CORRÊA-OLIVEIRA R, ZANI C.L. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *Int Immunopharmacol. Mar;* 3 (3):383-92; 2003.

SUMAN GUPTA, NISHI. Visceral Leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Ind Jou Med Res.* 2011. 133: 27-39.

STENGER, S; THÜRING, H; RÖLLINGHOFF, M; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1994; 180: 783-793.

STROBEL, G., DAYSE, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol and Molec Biol Reviews.* 2003. 67: 491-502.

SUDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Md. Int. Health, v.6, p: 849-854; 2004.*

GUPTA. S., NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug Discovery. *Indian J Med Res 133: p27-39; 2011.*

TAIT J.F., SMITH C., AND WOOD B.L. Measurement of Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes and Platelets by Whole-Blood Flow Cytometry with Annexin V. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 25 (5): Setembro 15: 271–278; 1999.

TIUMAN, T.S., SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T. DIAS FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Inter Jou Inf Dis.* 2011. 15:525-532.

THURM, C.W., HALSEI, J.F. Measurement of cytokine production using whole-blood. *Curr Protoc in Immunology.* 2005. 10: 47-66.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184(1):39-51; 1995

VIANA KF, FIUZA JA, GANNAVARAM S, DEY R, SELVAPANDIYAN A,

BARTHOLOMEU DC, SILVEIRA-LEMOS DD, BUENO LL, DUTRA WO, FUJIWARA RT, NAKHASI HL, GIUNCHETTI RC. Application of rapid in vitro co-culture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites (LdCen(-/-)). *Parasit Vectors*. 2016.

VIANA KF, AGUIAR-SOARES RD, KER HG, RESENDE LA, SOUZA-FAGUNDES EM, DUTRA WO, FUJIWARA RT, DA SILVEIRA-LEMOS D, SANT'ANA RDE C, WARDINI AB, ARAÚJO MS, MARTINS-FILHO OA, REIS AB, GIUNCHETTI RC. Setting the proportion of CD4+ and CD8+ T-cells co-cultured with canine macrophages infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*. 2015. Jul 30;211(3-4):124-32.

VIANA KF, AGUIAR-SOARES RD, ROATT BM, RESENDE LA, DA SILVEIRA-LEMOS D, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA, MOURA SL, ZANINI MS, ARAÚJO MS, REIS AB, GIUNCHETTI RC. Analysis using canine peripheral blood for establishing in vitro conditions for monocyte differentiation into macrophages for *Leishmania chagasi* infection and T-cell subset purification. *Vet Parasitol*. 2013. Nov 15;198(1-2):62-71.

VOULDOUKIS, I; RIVEROS-MORENO, V; DUGAS, B; OUAZ, FA; BECHERAL, P; DEBRE, P; MONCADA, P; MOSSALAYI, MD. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface. *Proceed of the Nat Acad of Sciences*. 1995; 92: 7804-7808.

WATFORD, WT; MORIGUCHI, M; MORINOBU, A; O'SHEA, JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003; 14: 361–368.

WEIGLE, K AND SARAVIA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 1996; 14: 433-450.

WILSON, ME; JERONIMO, SMB; PEARSON, RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathology*. 2005; 38: 147-160.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the Geneva. 22-26; *March 2010*.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Tropical Diseases Research. Leishmaniasis. [online]. Geneva; 2004. [Capturado 09 janeiro 2013] Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acessado em fevereiro 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Tropical Diseases Research. Leishmaniasis. [online]. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/disease-epidemiology/en/print.html>> Acessado em 25 de fevereiro de 2016.

YOUNG D.G, LAWYER R.G. New World vectors of the leishmaniasis. *Curr Top Vector Res* 4: 29-71; 1987.

ZANDBERGEN, G.V; KLINGER, M; MUELLER, A; DANNEMBERG, S; GEBERT, A; SOLBACH, W; LASKAY, T. Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J of Immunol*. 2004; 173: 6521-6525.