

Érica Leandro Marciano Vieira

**Avaliação das Características Fenotípicas
e Funcionais de Monócitos Humanos
Durante a Infecção por *Leishmania* e
Submetidos a Tratamento com Drogas
Leishmanicidas Convencionais e
Alternativas**

Departamento de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte, M.G.

2012

Érica Leandro Marciano Vieira

**Avaliação das Características Fenotípicas
e Funcionais de Monócitos Humanos
Durante a Infecção por *Leishmania* e
Submetidos a Tratamento com Drogas
Leishmanicidas Convencionais e
Alternativas**

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-Orientadora: Dr^a. Walderez Ornelas Dutra

Área de concentração: Imunologia

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de doutora.

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte, M.G.

2012

043 Vieira, Érica Leandro Marciano.
Avaliação das características fenotípicas e funcionais de monócitos humanos durante a infecção por Leishmania e submetidos a tratamento com drogas Leishmanicidas convencionais e alternativas [manuscrito] / Érica Leandro Marciano Vieira. – 2012.

205 f.; il. ; 29,5 cm.

Orientador: Kenneth John Gollob. Co-orientadora: Walderez Ornelas Dutra.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Leishmaniose – Tratamento - Teses. 2. Imunomodulação. 3. Tratamento - Qualidade – Teses. 4. Bioquímica – Teses. I. Gollob, Kenneth John. II. Dutra, Walderez Ornelas. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Bioquímica e Imunologia. IV. Título.

CDU: 577.1

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia dos Linfócitos do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com o Laboratório de Biologia das Interações Celulares (Departamento de Morfologia, ICB-UFMG) e o Serviço de Imunologia (Hospital Universitário Prof. Edgar Santos-UFBA).

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), National Institute of Health (NIH), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais (INCT-DT).

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity.”

-Albert Einstein-

AGRADECIMENTOS

Por todas as oportunidades e confiança ao longo de todo o percurso e pela sabedoria generosamente compartilhada que me ajudaram a conduzir esta tese. Agradeço de todo coração!

Ao Kenneth J. Gollob e a Walderez Ornelas Dutra

*“...Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir.
Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso.
E com confiança no que diz.*

*Fácil é analisar a situação alheia e poder aconselhar sobre esta situação.
Difícil é vivenciar esta situação e saber o que fazer ou ter coragem pra fazer.*

*Fácil é demonstrar raiva e impaciência quando algo o deixa irritado.
Difícil é expressar o seu amor a alguém que realmente te conhece, te respeita e te
entende...”*

- Reverência ao Destino, Carlos Drummond de Andrade-

*Todos os dias agradeço por tê-los em minha vida! Vocês foram fundamentais
nessa conquista! E só vocês sabem o por que...*

A Tatjana Keesen e ao Rodrigo Barros

"...a vida, Senhor Visconde, é um pisca - pisca.

A gente nasce, isto é, começa a piscar.

*Quem pára de piscar, chegou ao fim, morreu. Piscar é abrir e fechar os olhos - viver é
isso.*

É um dorme-e-acorda, dorme-e-acorda, até que dorme e não acorda mais.

A vida das gentes neste mundo, senhor sabugo, é isso. Um rosário de piscadas.

Cada pisco é um dia.

pisca e mama;

pisca e anda;

pisca e brinca;

pisca e estuda;

pisca e ama;

pisca e cria filhos;

pisca e geme os reumatismos;

por fim, pisca pela última vez e morre.

- E depois que morre - perguntou o Visconde.

- Depois que morre, vira hipótese. É ou não é?"

- Memórias de Emília, Monteiro Lobato, 1936 -

Aos que mais amo e vivem cada piscada comigo!

Aos meus pais Margot e Eustáquio, Pan, Dani, Thi, Adolfo, João Victor, Pedro Augusto, Guida,

Ronaldo, Larissa, Luisa e Tota.

“No princípio, Deus criou o céu e a terra. A terra estava sem forma e vazia; as trevas cobriam o abismo e um vento impetuoso soprava sobre as águas.

Deus disse: “Que exista a luz!” E a luz começou a existir. Deus viu que a luz era boa. E Deus separou a luz das trevas: à luz Deus chamou “dia”, e às trevas chamou “noite”.

Houve uma tarde e uma manhã: foi o primeiro dia.”

Gn 1, 1-5

A vida é cíclica como os dias, com luz e trevas. Mas, sempre há a esperança de que manhãs nascerão e noites se findarão. Mais uma fase é concluída, com seus dias e noites, e com a certeza de que valeu a pena cada etapa vivida e apreendida, sempre em boa companhia!

Aos colegas do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), em especial prof.Dr. Edgar Marcelino de Carvalho, Ms.Thais Delavechia, Dr. Paulo Machado, Dr. Luis Guimarães e Dr^a. Olívia Bacellar. Com vocês apreendi muito mais que a competência técnica, e sim um sentido ético em cada ação, além do compromisso com os projetos e valores sociais neles presentes. Obrigada pela convivência sempre rica, ética e fraternal!

Aos pacientes o meu agradecimento, respeito e admiração. Vocês foram parte fundamental nessa caminhada e tornam possível a aplicação da pesquisa básica.

O tempo de convivência foi curto, mas, o aprendizado e experiência foram enormes. Aos pesquisadores do SRI International: Jeremiah Malerich, Dr^a. Mary Tanga, Ellen Beaulieu, Dr. Steven Samuelsson e Janey Chan, pela convivência diária, trocas científicas e ajuda! À Dr^a. Kristien e Joost Mortelmans, pelo enorme carinho, atenção e amizade!

Aos professores Leonore e Leonard Herzenberg da Universidade de Stanford pela acolhida nas reuniões de laboratório e válidos ensinamentos, juntamente com seu grupo de pesquisa. Em especial ao Dr. Eliver Ghosn, pesquisador excepcional e responsável por ótimas conversas, jantares e sorrisos!

A Claude Salame, pelo carinho e companhia gentil! A pessoa “one hundred percent” que tive a felicidade de conhecer! Obrigada por sua atenção e finais de semana recheados de aventuras!

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB-UFMG), em especial as secretárias Celise e Grazi, Jamil, Ildinha, Poly, Sandra, Marli e Maria Helena pela convivência e amizade de muitos anos! A Frank pelo carinho e companheirismo! Aos professores Dr. Dawidson Gomes pela ajuda no fluorímetro, e Dr. Ronaldo Nagem pela convivência nos seminários de sexta-feira. À banca de qualificação composta pela prof^a. Dr^a. Leda Vieira, prof. Dr. João Trindade e prof. Dr. Ricardo Fujiwara (Dep. Parasitologia), pelas valiosas sugestões.

As professoras Dr^a. Maria Norma Melo e Dr^a. Mariângela Carneiro, do departamento de Parasitologia (ICB-UFMG) pelas ótimas sugestões, disponibilidade em ajudar e confiança.

Aos funcionários, professores e colegas de laboratório, especialmente prof. Dr. Germano, Dieguito, Sabrininha, Duh, Kayla, Dr^a. Jeane, Dr^a. Dani Barbosa, Dr^a. Fernanda Nobre, Dr^a. Janete, prof^a. Micena, prof^a. Dr^a. Cris Menezes, prof^a. Dr^a. Juliana Estanislau e prof^a. Dr^a. Paula Rocha. Como os dias foram doces e felizes na convivência com vocês.

Aos amigos da Turma de Bases I e II pelos apreendizados, momentos de distração e companheirismo, em especial Ric, Tatinha, Bruninho, Andrezza, Pati, Luigi, Nati, Léo, Caio, Mirinha e Jarina.

A querida Dr^a. Cynthia Cordeiro “Bixcoito”, que acompanhou lado a lado importantes momentos nessa trajetória, tornando-se uma amiga valiosa e um grande exemplo! E ao “guru” Dr. Rogério pelas boas dicas e risadas!

Ao amigo Vinícius Monteiro pelas tardes agradáveis, cafés e almoços na FaFar. Sua companhia, sempre paciente, fez esse caminho muito mais tranquilo!

A querida amiga Fernanda Coelho “Fefê”, companheira de bancada, risadas e viagem! Como sinto sua falta, principalmente nos seus “gueri-gueris”. Obrigada pela amizade, carinho e confiança.

A amiga Adriana Machado “Dridri”, em quem me apoiei muitas vezes! Seu carinho e pulinhos “devassos” sempre me deixavam feliz! É muito bom ter sua amizade e cuidado.

A Daniela Valente, minha companheira de quarto e de muitas lembranças boas e inesquecíveis. Sei que vai brilhar com sua energia e competência! Você foi muito especial para mim neste último ano! Obrigada por todo seu carinho e convivência!

Ao Leonardo Damasceno pelas longas noites, regadas com boas conversas, vinhos e músicas! Foi muito bom conviver com você!

Aos meus amigos queridos Júnia Pacheco, Rainer Couto, Bruno Schamber e Andrezza Santiago, Elizabeth Moreno, pelos cafés filosóficos, ombro amigo, cervejinha reconfortante e apoio científico!

Ao Lúcio Chamon, por me ajudar à aventurar por novos caminhos, antes, presentes apenas em desejos e sonhos! Você é um amigo muito querido, e presente na minha vida!

A minha grande amiga Marcelle Marie, por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida, de alegrias ou tristeza. Não me esquecerei nunca do seu cuidado e carinho! Seu apoio se tornou um porto seguro na minha vida!

Aos meus familiares, especialmente minha avó Maria e Tia Norma, e queridos amigos e colegas pela paciência e compreensão com as noites em claros, finais de semanas ausentes, viagens e trabalho intenso. Todos contribuíram para essa conquista!

“E de repente a vida te vira do avesso e você descobre que o avesso, é o lado certo”.

– Caio Fernando Abreu –

Ao Marco “Tota” Novaes e Luisa, que trouxeram um brilho especial a minha vida, agregando pessoas queridas, cuidado, amor e muitas felicidades.

E a todos que, de alguma forma, apoiaram-me com incentivos, sorrisos, reagentes, atenção, confiança e cuidado, muito obrigada!

Lista de Abreviações

APC	Células apresentadora de antígeno
CD	Grupo de diferenciação (cluster of differentiation)
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CTLA-4	Antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico
DC	Células dendríticas
DT-15	Droga teste número 15
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
FITC	Isocianato de fluoresceína
FACS	Fluorecence Activated Cell Sorter
FSC	Forward Angle Light Scatter
Foxp3	Fator de transcrição <i>forkhead box p3</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GM-CSF	Fator de crescimento estimulador de colônia de macrófago
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolisacarídeos
LV	Leishmaniose visceral
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide 88
NAC	N-acetilcisteína
NF-κB	Fator nuclear kapa B
NK	Células matadoras naturais (<i>natural killer</i>)
NKT	Células T matadoras naturais (<i>T natural killer</i>)
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos

PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
RNS	Espécies reativas ao nitrogênio
RPM	Rotações por minuto
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
SLA	Soluble <i>Leishmania</i> antigen
TCR	Receptor de Célula T
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral-beta
Th	Linfócito auxiliar (T <i>helper</i>)
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras específicas
TRIF	Adaptador contendo domínios TIR e indutor de IFN- γ

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE FIGURAS.....	XX
RESUMO.....	XXIX
ABSTRACT.....	XXXI
1.0- INTRODUÇÃO	33
2.0 – REVISÃO DA LITERATURA.....	36
2.1 – EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE.....	36
2.2 - MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E <i>LEISHMANIA</i>	38
2.3. TRATAMENTOS QUIMIOTERÁPICOS NA LEISHMANIOSE	42
2.3.1. <i>Naftoquinonas - DT. 15</i>	44
2.3.2. <i>N-Acetilcisteína e Suas Propriedades</i>	46
3.0 - OBJETIVOS	50
3.1 - OBJETIVO GERAL	50
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3.2.1 – <i>Objetivos Específicos - 1ª Parte</i>	50
3.2.2 - <i>Objetivos Específicos - 2ª Parte</i>	50
4.0- MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 – MATERIAL E MÉTODOS - PARTE 1 - AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE MONÓCITOS CD14 ⁺ PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA	52
4.1.1 - <i>Indivíduos</i>	52
4.1.2 – <i>Preparação do Antígeno Solúvel de Leishmania - SLA</i>	53
4.1.3 - <i>Purificação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)</i>	53
4.1.4 – <i>Marcação de Moléculas de Superfície de Monócitos</i>	54
4.1.5 – <i>Marcação Intracelular de Citocinas em Monócitos</i>	55
4.1.6 – <i>Estratégia de Análise</i>	55
4.1.7 - <i>Análises Estatísticas</i>	56
4.2 – PARTE 2 - EFEITO LEISHMANICIDA DE DIFERENTES DROGAS EM CULTURAS DE <i>LEISHMANIA</i> E EM CMSP INFECTADAS <i>IN VITRO</i> POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	57

4.2.1 – Reagentes	57
4.2.2 - Cultura de Leishmania.....	58
4.2.3 – Experimentos <i>in vitro</i> Realizados com Diferentes Espécies de Leishmania Submetidas ao Tratamento com Anfotericina B e Droga Teste nº.15 – DT.15.....	58
4.2.4 – Experimentos <i>in vitro</i> Realizados com Diferentes Espécies de Leishmania Submetidas ao Tratamento com Glucantime® e NAC.....	59
4.2.5 – Avaliação do Crescimento Celular por Contagem em Câmara de Neubauer ..	59
4.2.6 - Ensaio de Proliferação e Morte Celular por Diluição Limitante.....	60
4.2.7 – Avaliação da Morte da Leishmania por Coloração com Anexina V e Iodeto de Propídio	62
4.2.8 – Avaliação da Proliferação Celular por Coloração com CFSE	62
4.2.9 – Estratégia de Análise para a Avaliação da Morte Celular por Anexina V e Iodeto de Propídio e Proliferação Celular por CFSE nas Diferentes Espécies de Leishmania	63
4.2.10 – Separação das Formas Promastigotas Metacíclicas por Gradiente de Ficoll 400® para Infecção <i>in vitro</i> das CMSP.....	64
4.2.11 - Infecção <i>in vitro</i> das CMSP de Indivíduos Saudáveis por Diferentes Espécies de Leishmania	65
4.2.12 – Delineamento Experimental Realizado com os Monócitos Provenientes de CMSP de Indivíduos Saudáveis e Infectados, <i>in vitro</i> , com Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos ao Tratamento com Anfotericina B, Glucantime®, DT.15 e NAC.....	65
4.2.13 – Avaliação da Morte Celular por Anexina V e Iodeto de Propídio dos Monócitos Infectados <i>in vitro</i> ou não por Diferentes Espécies de Leishmania	66
4.2.14 – Estratégia de Análise Utilizada na Citômetria de Fluxo para a Avaliação da Morte Celular por Anexina V e Iodeto de Propídio dos Monócitos, Infectados <i>in vitro</i> ou não, por Diferentes Espécies de Leishmania.....	67
4.2.15 – Marcação das Moléculas de Superfície em Monócitos Provenientes de CMSP Infectados <i>in vitro</i> por Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos aos Tratamentos com Diversas Drogas	68
4.2.16 – Marcação Intracelular de Citocinas nos Monócitos de CMSP Infectados <i>in vitro</i> por Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos aos Tratamentos com Diversas Drogas	68
4.2.17 – Estratégia de Análise dos Monócitos de CMSP Infectados <i>in vitro</i> por Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos aos Tratamentos com as Drogas ..	69

4.2.18 - Análises Estatísticas.....	70
5.0 – RESULTADOS	71
5.1 – PARTE 1- AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE MONÓCITOS CD14 ⁺ PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA	71
5.1.1 – Expressões de Moléculas Co-Estimuladoras em Monócitos CD14 ⁺ de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea	71
5.1.2 – Expressões Intracelular de Citocinas em Monócitos CD14 ⁺ de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea	73
5.1.3 – Correlações entre a Produção de Citocinas e Moléculas Co-estimuladores de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea	76
5.1.4 – Expressão do Receptor do Tipo Toll 9 (TLR9) em Monócitos CD14 ⁺ de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea	78
5.1.5 – Correlação entre a Área da Lesão e a Expressão de TLR9 em Indivíduos com Leishmaniose Cutânea	80
5.2 - PARTE 2- EFEITO LEISHMANICIDA DE DIFERENTES DROGAS EM CULTURAS DE <i>LEISHMANIA</i> E EM CMSP INFECTADAS <i>IN VITRO</i> POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	81
5.2.1 – Parte 2-A - Avaliação do Efeito Leishmanicida das Drogas Anfotericina B, Glucantime® e DT.15	81
5.2.1.1 – Avaliação do Efeito Leishmanicida das Drogas Anfotericina B e DT.15 em Culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	81
5.2.1.2 – Efeito das Drogas Anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em Monócitos de CMSP de Indivíduos Saudáveis Após Infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	92
5.2.2 – Parte 2-B - Avaliação do Efeito Leishmanicida da N-Acetilcisteína	121
5.2.2.1 – Avaliação do Efeito Leishmanicida das Drogas Glucantime® e NAC em Culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	121
5.2.2.2 – Efeito das Drogas Anfotericina B e Glucantime®, Associado ou não a NAC, em Monócitos de CMSP de Indivíduos Saudáveis Após Infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	129
6.0 – DISCUSSÃO.....	154
6.1 – PARTE 1- AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE MONÓCITOS CD14 ⁺ PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA	154
6.2 - PARTE 2- EFEITO LEISHMANICIDA DE DIFERENTES DROGAS EM CULTURAS DE <i>LEISHMANIA</i> E EM CMSP INFECTADAS <i>IN VITRO</i> POR DIFERENTES ESPÉCIES	161

7.0 – CONCLUSÕES.....	183
8.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184
APÊNDICE	192
APÊNDICE A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	192
APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS	201
ANEXO	205
ANEXO A - PARECER DO MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA LIBERAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO MEDICAMENTO GLUCANTIME®	205

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea – P1 a P10 .76	
Tabela 2: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea – P11 a P16	80
Tabela 3: Sumário dos resultados do efeito leishmanicida das drogas anfotericina B e DT.15 em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	91
Tabela 4: Sumário de resultados da morte celular e infecção após 24 e 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> .101	
Tabela 5: Sumário de resultados da expressão de moléculas co-estimuladoras após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	118
Tabela 6: Sumário de resultados da expressão de moléculas citocinas após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	119
Tabela 7: Sumário de resultados do efeito leishmanicida da droga Glucantime®, associado ou não a NAC, em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	128
Tabela 8: Sumário de resultados do efeito leishmanicida das diferentes concentrações da NAC em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	128
Tabela 9: Sumário dos resultados da morte celular e infecção após 24 e 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	134
Tabela 10: Sumário dos resultados da expressão de moléculas co-estimuladoras após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a	

NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*150

Tabela 11: Sumário dos resultados da expressão de citocinas após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas drogas anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i> no interior do hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	38
Figura 2: Estrutura química bidimensional da naftoquinina denominada droga teste número 15 (DT.15).	45
Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio no ciclo redox das quininas em conjunto com o ciclo redox da glutatona.....	47
Figura 4: Estrutura química bidimensional da N-acetilcisteína.	48
Figura 5: Estratégia de análise utilizada para seleção de monócitos CD14 ⁺ expressando TLR9 e a citocina TNF em pacientes com leishmaniose cutânea.	56
Figura 6: Desenho esquemático do ensaio de diluição limitante.	61
Figura 7: Estratégia de análise utilizada para avaliação da morte celular por expressão de anexina V e iodeto de propídio, e proliferação celular por CFSE nas diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	64
Figura 8: Estratégia de análise utilizada para avaliação da expressão de anexina V e iodeto de propídio em monócitos de CMSP provenientes de indivíduos saudáveis e infectados <i>in vitro</i> com diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	67
Figura 9: Estratégia de análise utilizada para avaliação da expressão de marcadores de superfície e intracelulares em monócitos infectados <i>in vitro</i> por diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	70
Figura 10: Expressão de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e da molécula CD16 em monócitos CD14 ⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos não-infectados, isolados de <i>ex vivo</i> , ou após cultura <i>in vitro</i> com meio ou SLA.	72
Figura 11: Pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram alta frequência TNF em monócitos CD14 ⁺ , principalmente após estímulo com SLA.....	73

Figura 12: Expressão de IL-10 por monócitos CD14 ⁺ de pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> não apresenta alterações entre os grupos e as diferentes condições de cultura.....	74
Figura 13: Monócitos CD14 ⁺ de pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> produzem menos IL-12 em relação aos dos indivíduos não infectados.	75
Figura 14: Correlação positiva entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 em monócitos CD14 ⁺ de pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> , nas condições <i>ex vivo</i> e SLA.....	77
Figura 15: Moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 correlacionam-se positivamente com a produção de IL-12 em monócitos CD14 ⁺ de pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> , na condição SLA.....	77
Figura 16: Moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 correlacionam-se negativamente com a expressão de CD86 em monócitos CD14 ⁺ de pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> na condição <i>ex vivo</i>	78
Figura 17: Monócitos CD14 ⁺ de pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> apresentam alta expressão de TLR9 após estímulo com SLA.....	79
Figura 18: Receptor TLR9 correlaciona-se positivamente com a área total da lesão em pacientes infectados por <i>L. braziliensis</i> , na condição meio.	80
Figura 19: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos leishmanicida das drogas anfotericina B e DT.15 em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	81
Figura 20: Drogas anfotericina B e DT.15 apresentam atividade leishmanicida em cultura de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> por contagem dos parasitos em câmara de Neubauer.....	82
Figura 21: Drogas anfotericina B e DT.15 apresentam atividade leishmanicida em cultura de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> por diluição limitante.....	83
Figura 22: Tratamento com DT.15 não induziu a morte celular e apoptose como o tratamento com a droga padrão anfotericina B após 24 horas de culturas em <i>L. major</i>	85
Figura 23: Droga DT.15 aumenta morte celular e apoptose após 48 horas, mas não como a droga de tratamento padrão anfotericina B em culturas de <i>L. major</i>	86

Figura 24: Taxa de morte celular após 24 ou 48 horas de tratamento com DT.15 e anfotericina B em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	87
Figura 25: DT.15 inibe proliferação de <i>L. major</i> forma semelhante a anfotericina B após 24 e 48 horas de cultura.	88
Figura 26: DT.15 inibe a proliferação celular de forma semelhante ao tratamento com anfotericina B após 24 ou 48 horas de culturas em <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	90
Figura 27: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos das drogas Anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em culturas de CMSP infectadas <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	92
Figura 28: Perfil celular de morte e apoptose de monócitos não infectados após 24 horas de tratamento com Anfotericina B, Glucantime® e DT.15.	93
Figura 29: Perfil celular de morte e apoptose dos monócitos de CMSP infectadas <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> após 24 horas de tratamento com Anfotericina B, Glucantime® e DT.15.	94
Figura 30: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15, em culturas de CMSP infectadas <i>in vitro</i> ou não com as espécies de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	96
Figura 31: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15, em culturas de CMSP infectadas <i>in vitro</i> ou não com as espécies de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	97
Figura 32: Perfil de infecção dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após de 24 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15.....	98
Figura 33: Infecção dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15.....	99
Figura 34: Intensidade média de fluorescência do CFSE em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15.....	100

Figura 35: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	103
Figura 36: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	104
Figura 37: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	105
Figura 38: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	106
Figura 39: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	107
Figura 40: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	108
Figura 41: Intensidade média de fluorescência de HLA-DR em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1 e 3 µM), Glucantime® (100 e 300 µg/ml) e DT.15 (3 e 9 µM).....	109
Figura 42: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48	

horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	110
Figura 43: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	111
Figura 44: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	112
Figura 45: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	113
Figura 46: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	114
Figura 47: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	115
Figura 48: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).	116
Figura 49: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).	117

Figura 50: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos leishmanicida das drogas Glucantime® e N-acetilcisteína (NAC) em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	121
Figura 51: Glucantime® e NAC apresentam atividade leishmanicida após 24 ou 48 horas de tratamento em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	122
Figura 52: Glucantime® e NAC apresentam atividade leishmanicida após 24 ou 48 horas de tratamento em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> por diluição limitante.	123
Figura 53: Avaliação da morte celular e apoptose após 24 horas de tratamento com Glucantime®, associado ou não a NAC, em culturas de <i>L. major</i>	124
Figura 54: Tratamento com Glucantime® associado a NAC não induziu à morte celular e apoptose em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas.	125
Figura 55: Avaliação da morte celular e apoptose após 24 horas de tratamento com N-acetilcisteína em culturas de <i>L. major</i>	126
Figura 56: Tratamento com NAC induziu à morte celular e apoptose em culturas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas.	127
Figura 57: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos das drogas anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC, em culturas de CMSP infectadas por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	129
Figura 58: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em culturas de CMSP infectadas <i>in vitro</i> ou não com as espécies de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	130
Figura 59: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em culturas de CMSP infectadas <i>in vitro</i> ou não com as espécies de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i>	131
Figura 60: Infecção dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC.....	132

Figura 61: Intensidade média de fluorescência do CFSE em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> coradas por CFSE após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC.	133
Figura 62: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	135
Figura 63: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	136
Figura 64: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).....	137
Figura 65: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	138
Figura 66: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	139
Figura 67: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	140
Figura 68: Intensidade média de fluorescência de HLA-DR em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L.</i>	

<i>major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1 e 3 µM) e Glucantime® (100 e 300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	141
Figura 69: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	142
Figura 70: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	143
Figura 71: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).....	144
Figura 72: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).....	145
Figura 73: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).....	146
Figura 74: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).....	147
Figura 75: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....	148

Figura 76: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).....149

RESUMO

A leishmaniose é uma doença endêmica causada pela infecção por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Os monócitos/macrófagos desempenham um importante papel na proteção do hospedeiro contra as infecções por serem capazes de fagocitar e gerar moléculas tóxicas como óxido nítrico (NO) no combate ao parasito. Os receptores do tipo Toll (TLR) possuem um papel essencial na resposta imune contra infecções, mas, pouco se sabe sobre seu papel na infecção humana por *Leishmania braziliensis*. A busca por novas abordagens quimioterápicas é uma necessidade para o controle e tratamento da leishmaniose. Neste contexto, o estudo de moléculas imunomoduladoras e de compostos naturais com potencial adjuvante ao tratamento convencional desponta como uma importante estratégia. Produtos naturais conhecidos como extratos de plantas medicinais são popularmente utilizados como medicamentos desde tempos antigos. Dentre esses, encontram-se as naftoquinonas obtidas das plantas da família Biognoniaceae, abundante em várias espécies e muitas nativas no Brasil. Esses extratos de plantas já foram estudados em diversas doenças, apresentando atividade antimicrobiana comprovada, além da ação antiinflamatória e antineoplásica. Outro composto estudado por suas diversas ações no sistema imunológico foi a N-acetilcisteína (NAC), precursora da glutatona. Sua ação tem sido avaliada na fibrose cística, aterosclerose, infecções por HIV e em diferentes tipos de cânceres. Estudos prévios demonstraram efeito da NAC na leishmaniose, em que a sua administração via oral em camundongos infectados por *L. major* reduziu a lesão cutânea e o parasitismo. Neste trabalho, investigou-se a expressão de TLR9 em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), bem como a expressão de moléculas co-estimuladoras e citocinas em monócitos CD14⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea decorrente da infecção por *L. braziliensis*. Investigaram-se também possíveis candidatos terapêuticos ao tratamento da leishmaniose, como a naftoquinona denominada DT.15 e a NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) major*. Analisou-se a atividade leishmanicida desses compostos, assim como sua influência na expressão de marcadores de ativação, moléculas co-estimuladoras e na produção de citocinas. Os resultados demonstraram redução na frequência de CD80 e CD86, e aumento na frequência de CD16 nos monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea em relação aos indivíduos não-infectados (NI). Em seguida, análises de correlações indicaram que as moléculas CD80 e CD40 correlacionaram-se positivamente entre si e com a produção de IL-12, no entanto, negativamente em relação a expressão de CD86. Encontrou-se também uma elevada produção de TNF e uma baixa expressão de IL-12 pelos monócitos dos pacientes com LC, quando comparados aos indivíduos NI. Com relação à expressão de TLR9, encontrou-se uma elevada expressão desse receptor quando as células dos pacientes foram submetidas a cultura com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), e quando comparado com os indivíduos NI na presença do estímulo. De forma interessante, a expressão de TLR9 correlacionou-se positivamente com o tamanho da área da lesão nos pacientes. Esses achados sugerem que houve uma regulação negativa na expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, existindo uma relação tênue entre esses marcadores. No entanto, houve aumento na expressão de TLR9, CD16 e TNF nos monócitos infectados, sugerindo uma imunomodulação dessas células com possíveis mecanismos compensatórios. Na segunda parte dessa tese, notou-se que as drogas DT.15 e NAC apresentaram atividade leishmanicida sobre diferentes espécies de *Leishmania*, principalmente no tratamento direto das culturas celulares desses parasitos. Demonstrou-se redução do número de parasitos, aumento da taxa de

morte e inibição da proliferação celular em relação ao controle sem medicamento. Os resultados das drogas testes (DT.15 e NAC) foram semelhantes aos encontrados com as drogas de tratamento padrão (anfotericina B e Glucantime®). Nos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis, submetidas à infecção *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania*, os resultados encontrados não apresentaram diferenças expressivas como os visualizados nas culturas dos parasitos isolados. No entanto, observaram-se importantes alterações, como baixa citotoxicidade dos compostos testes em células humanas, alteração dos marcadores de ativação, especialmente CD11b, CD80 e CD86. Além disso, visualizou-se como as espécies de *Leishmania* apresentaram diferenças na expressão de marcadores de ativação e citocinas, bem como os tratamentos com as drogas padrões afetaram diferentemente estas espécies no modelo de infecção *in vitro*. Assim, os resultados deste estudo demonstraram uma caracterização dos monócitos dos indivíduos infectados em áreas endêmicas, como em modelos de infecção *in vitro*, sendo relevante uma vez que estas células podem desempenhar um importante papel durante a infecção. Além disso, os compostos avaliados (DT.15 e NAC), apresentaram potencial terapêutico tanto em culturas isoladas de *Leishmania*, quanto nas células infectadas *in vitro*. No entanto, novos estudos são necessários para determinar os mecanismos por de trás desses potenciais candidatos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease caused by infection with protozoa of the genus *Leishmania*, affecting millions of people worldwide. Monocytes/macrophages play an important role in host defense against infections by being able to phagocytose and generate toxic molecules such as nitric oxide (NO) in combating parasite. The Toll-like receptors (TLR) have an essential role in the immune response against infections, but little is known about their role in human infection with *Leishmania braziliensis*. The search for new chemotherapeutic approaches is a need for control and treatment of leishmaniasis. In this context, molecules and immunomodulatory natural compounds with an adjuvant potential to conventional therapy are emerging as an important strategy for new studies. Natural products known as herbal extracts are popularly used as medicine since ancient times. Among these, we have obtained naftoquininas of the family Biognoniaceae, abundant in many species and with some species native in Brazil. These plant extracts have been studied in various diseases, with proven antimicrobial activity, in addition to anti-inflammatory action and antineoplastic. Another compound studied for its various actions on the immune system was N-acetylcysteine (NAC), a compound capable of increasing greatly intracellular glutathione. Its action has been assessed in cystic fibrosis, atherosclerosis, HIV infection and in different types of cancers. Previous studies demonstrated that oral treatment with NAC reduced skin lesion and parasitism in a murine model for cutaneous leishmaniasis, caused by *L. major* infection. In this work, we investigated costimulatory molecules, TLR9 and cytokine expression by CD14⁺ monocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* infection. We also investigated possible therapeutic candidates for leishmaniasis treatment, such as a naphthoquinone called DT.15 and NAC using monocytes from PBMC of healthy donors, and infected *in vitro* with *L. (Viannia) braziliensis*, *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. We analyzed the leishmanicidal activity of these compounds, characterizing the expression of activation markers and cytokine production. The results concerning the PBMC of patients infected by *L. braziliensis* and residents in the endemic area of Corte de Pedra, demonstrated a reduction in the frequency of CD80 and CD86, and increased frequency of CD16, compared to non-infected individuals (NI) in different culture conditions. Additionally, correlation analysis indicated that CD80 and CD40 molecules were positively correlated with each other and the production of IL-12, however, negatively with CD86 expression. While evaluating these individuals, we found a high production of TNF and a low expression of IL-12 compared to NI individuals. TLR9 expression, were high in patients submitted to soluble *Leishmania* antigen (SLA) cultures, and when compared to individuals NI in the presence of the stimulus. Interestingly, the expression of TLR9 by monocytes correlates positively with the lesion size in the patients. These findings suggest that there was a negative regulation in the expression of costimulatory molecules CD80 and CD86, and a relationship exists between these markers. However, increased expression of TLR9, CD16 and TNF on infected monocytes, suggest an immunomodulatory compensatory mechanism. In the second part of this thesis, it was noted that the drugs DT.15 and NAC showed leishmanicidal activity on different strains of *Leishmania*, mainly in the direct treatment of these parasites. The results showed that the drugs reduced parasites numbers, increased the rate of death and inhibited parasite proliferation when compared to control media. The results of the test drugs (DT.15 and NAC) were similar to standard treatment with amphotericin B and Glucantime®. In monocytes from healthy individuals infected *in vitro* by different strains of *Leishmania*, the results showed no significant differences as seen in the cultures of parasite isolates. However, there were important changes, such as low cytotoxicity of test compounds in

human cells, changes in activation markers, especially CD11b, CD80 and CD86. In addition, different strains of *Leishmania* showed a distinct profile of cytokines and activation marker expression, as well as the treatments with conventional drugs in this *in vitro* model of infection. In conclusion, the results of this study demonstrated that monocytes play an important role in the course and development of human leishmaniasis, both in the characterization of infected individuals in endemic areas, as well as *in vitro* models of infection. Furthermore, the compounds evaluated (DT.15 and NAC) showed therapeutic potential on the *Leishmania* isolated cultures, as well as using *in vitro* infected cells. However, further studies are needed to determine the mechanisms behind these potential therapeutic candidates.

1.0- INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada pela infecção com protozoários do gênero *Leishmania*. Essa doença pode ser caracterizada pelo desenvolvimento de lesões dérmicas, observadas nas diferentes formas clínicas que podem ser: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), ou leishmaniose mucocutânea (LMC), ou caracterizada pelo envolvimento sistêmico no caso da forma clínica leishmaniose visceral (LV), que é potencialmente fatal em grupos de risco (crianças, idosos, grávidas e portadores do vírus HIV), e na ausência do tratamento.

Dentre as 20 espécies de *Leishmania*, serão abordadas nesse estudo: *Leishmania (Vianna) braziliensis* presente no “Novo Mundo” (Américas) cuja a infecção causa lesões cutâneas e mucocutâneas; *Leishmania (Leishmania) major* mais presente no “Velho Mundo” (Ásia e África) e responsável pelo desenvolvimento de lesões cutâneas e algumas vezes também pela forma visceral; e a *Leishmania (Leishmania) infantum* encontrada na Europa, sul da África e América do Sul, responsável pelo desenvolvimento da forma visceral (WHO 2012). Essas espécies de *Leishmania* têm sido estudadas com o intuito de compreender a resposta imune inata e adquirida nos hospedeiro vertebrados infectados, bem como a interação entre parasito-hospedeiro (CDC 2012; WHO 2012).

A *Leishmania* é um parasito intracelular que habita macrófagos de mamíferos, onde sobrevivem e crescem como amastigotas não flageladas. A compreensão do papel das células envolvidas na imunidade inata na leishmaniose humana pode auxiliar a desvendar a real importância dessas células durante a doença ativa. A imunidade inata é composta por células capazes de responder prontamente a estímulos, iniciando uma cascata inflamatória, envolvendo diversas moléculas como quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão, influenciando a formação da resposta imune adquirida. Os receptores do tipo Toll (TLR) presentes em células da imunidade inata, principalmente em macrófagos e células dendríticas, estão envolvidos no reconhecimento de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) e ativação de uma resposta celular a partir do reconhecimento de antígenos. Estes receptores são importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na discriminação do patógeno e no curso da resposta inflamatória causada pelo parasito (Medzhitov and Janeway 1998; Medzhitov 2007).

Além de compreender os mecanismos responsáveis pela resposta imunológica ao parasito, a busca por novas abordagens quimioterápicas vem sendo bastante estudada,

uma vez que na leishmaniose a resistência e a refratariedade ao tratamento com as drogas convencionais tem se tornado crescente. A procura por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas tem se tornado uma eficiente alternativa devido à crescente resistência dos microrganismos patogênicos frente aos antimicrobianos disponíveis no mercado. Desde o antigo Egito o homem utiliza extratos de plantas que possuem naftoquinonas para diversos fins como cosméticos e terapêuticos. Dentre esses, destacam-se as naftoquininas da família Biognoniaceae, abundantes em várias espécies de plantas encontradas principalmente na Ásia, África e América do Sul, sendo muitas nativas do Brasil (Silva 2012).

Esses extratos já foram estudados em diversas doenças, apresentando atividade antimicrobiana comprovada contra bactérias e protozoários, além da ação antiinflamatória e antineoplásica (Yamashita, Kaneko et al. 2007; Lira, Sester et al. 2008; Zofou, Kengne et al. 2011; Zofou, Tene et al. 2011). A naftoquinona utilizada nesse estudo foi extraída da planta *Kigelia africana*, da família das Biognoniaceae, da série Pinnatal, e desenvolvida pelo pesquisador Jeremiah Malerich do centro de pesquisa SRI International, em Menlo Park, na Califórnia, EUA.

Inúmeras substâncias presentes nas células dos mamíferos, como o tripeptídeo tiólico glutationa, possuem ações benéficas na manutenção, trofismo, proteção e diferenciação celular, incluindo células do sistema imunológico. Incluem-se como funções da glutationa neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), participar do transporte de aminoácidos, síntese de DNA, atividade enzimática e expressão gênica (Kelly 1998).

Outro importante composto avaliado por suas diversas ações no sistema imunológico foi a N-acetilcisteína (NAC), precursora da glutationa. A NAC atua como um antioxidante, seja por atuar diretamente na glutationa redutase (GSH), ou indiretamente, servindo como precursor para a mesma (Issels, Nagele et al. 1988; Aruoma, Halliwell et al. 1989; Kelly 1998). A NAC tem sido amplamente estudada em diversos processos patológicos, como infecções por HIV, aterosclerose, câncer e fibrose cística (Kelly 1998; Aluigi, De Flora et al. 2000; Zafarullah, Li et al. 2003; Tirouvanziam, Conrad et al. 2006). Mais recentemente, em modelos animais infectados por *L. major* e *L. amazonensis*, a NAC promoveu aumento da atividade leishmanicida, causando mudanças no microambiente de citocinas e aumento na expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), o que permitiu maior eficiência no controle do parasito (Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003; Cruz, Fonseca et al. 2008; Monteiro, Marques et al. 2008). Importante ressaltar

que o óxido nítrico (NO) é considerado uma molécula chave na ação contra patógenos intracelulares, particularmente a *Leishmania*. A expressão da iNOS, e consequente produção de NO por macrófagos infectados tem sido correlacionada com a resistência da *Leishmania* em modelos murinos bem como em humanos infectados (Giustarini, Milzani et al. 2003; de Souza, Yokoyama-Yasunaka et al. 2006).

Dessa forma, além de caracterizar os monócitos presentes no sangue periférico de indivíduos infectados por *L. braziliensis*, residentes na área endêmica de Corte de Pedra com relação a expressão de marcadores de ativação, produção de citocinas e expressão intracelular do receptor TLR9, avaliamos também o efeito leishmanicida dos compostos DT.15 e NAC. Assim, estudou-se o efeito adjuvante da NAC e da naftoquinona droga teste 15 (DT.15), aliados ou não ao tratamento convencional com antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e anfotericina B (Anforicin B®), em monócitos de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania*.

2.0 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Epidemiologia e Patogênese da Leishmaniose

Protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, são responsáveis pelo desencadeamento das formas clínicas cutâneas localizada ou disseminada, mucocutânea e visceral da leishmaniose. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam ameaçadas de adquirir leishmaniose em 88 países ao redor do mundo, incluindo o Brasil (WHO 2010; WHO 2012).

As quatro formas clínicas da leishmaniose são encontradas no Brasil, com o predomínio da forma cutânea causada pela espécie *L. braziliensis*. Segundo o epidemiologista Paulo Sabroza da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Ensp) da FIOCRUZ, no Brasil, na última década, o registro de casos confirmados tem variado entre 30 e 40 mil por ano (FIOCRUZ 2010). A região do Brasil com maior coeficiente de detecção da doença é a região Norte, atingindo quase cem habitantes para cada cem mil. Em seguida, estão as regiões Centro-Oeste, com 41,85, e Nordeste, com 26,50 casos para cada cem mil pessoas (FIOCRUZ 2010).

Dentre as três formas clínicas encontradas no Brasil, a leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por lesões exclusivamente cutâneas, ulceradas ou não, que cicatrizam após algumas semanas ou meses de tratamento (Coutinho, Oliveira et al. 1996). A forma mucocutânea caracteriza-se pela presença de lesões desfigurantes na área mucosa, principalmente na região do nariz, boca e orofaríngea, com ou sem o acometimento cutâneo concomitante. A forma cutânea difusa, geralmente observada em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes tratados de calazar, é caracterizada pelo aparecimento de lesões crônicas e disseminadas, associadas à presença de inúmeros parasitos no interior de macrófagos e fortes reações de hipersensibilidade tardia (Cunningham 2002).

A leishmaniose visceral ou calazar, é uma doença endêmica em 60 países, com 500 mil novos casos/ano e 5 mil mortes por ano, sendo que 90% dos casos são relatados em apenas 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (Herwaldt 1999; World Health Organization 2011). Os principais agentes etiológicos são as espécies *L.*

donovani e *L. infantum* que apresentam acentuado tropismo pelo baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides, sendo esta considerada a forma mais grave da doença, com elevada taxa de mortalidade (Gantt, Goldman et al. 2001).

A leishmaniose provocada por *L. major* é amplamente estudada em murinos, devido a existência de modelos bem definidos de susceptibilidade e resistência a esta espécie de *Leishmania*. A *L. major* é encontrada no “velho mundo” principalmente no sul da Europa, nos países do norte da África e que circundam o mediterrâneo. Essa espécie de *Leishmania* é responsável, principalmente pela forma cutânea dessa doença (Horta, Mendes et al. 2011; CDC 2012).

As associações das características de cada espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro são de fundamental importância para o entendimento das manifestações clínicas da leishmaniose (Gollob, Antonelli et al. 2005). Destaca-se, neste contexto, a interação entre a *Leishmania* e o macrófago tendo, esta interação, um importante papel na patogênese da infecção (Getti, Cheke et al. 2008).

Os flebotomíneos da família Psychodidae, do gênero *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão das formas infectivas do parasito no novo mundo. Já no “Velho Mundo”, o hospedeiro invertebrado responsável pela infecção é do gênero *Phlebotomus*. A infecção ocorre durante o repasto sanguíneo com inoculação das formas promastigotas metacíclicas do parasito no hospedeiro vertebrado (Figura 1-1).

Logo após a penetração do parasito no tecido do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e se desenvolvem dentro dos vacúolos parasitóforos (Figura 1-2). Nos vacúolos, o parasito assume a forma amastigota (Figura 1-3), passando por ciclos intracelulares de multiplicação e crescimento exponencial (Figura 1-4). O flebótomo fêmea realiza o repasto sanguíneo, ingerindo macrófagos infectados com as amastigotas (Figura 1-5 e 6). Dentro do flebótomo, as amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino médio (Figura 1-7), multiplicando-se e migrando, posteriormente, para a probóscide do inseto (Figura 1-8). Após essa etapa, o ciclo reinicia-se, com infecção do hospedeiro vertebrado (Weigle and Saravia 1996; de Almeida, Vilhena et al. 2003).

A elevada carga parasitária gera, no hospedeiro vertebrado, um processo de reatividade celular diretamente relacionado aos mecanismos de resistência e também ao estabelecimento da doença (Mosser 1990; Hepburn 2003; Gollob, Antonelli et al. 2005). Também é bem estabelecido que o início da infecção está relacionado à habilidade do

parasito de se ligar e entrar no macrófago e inibir a atividade desta célula (de Almeida, Vilhena et al. 2003).

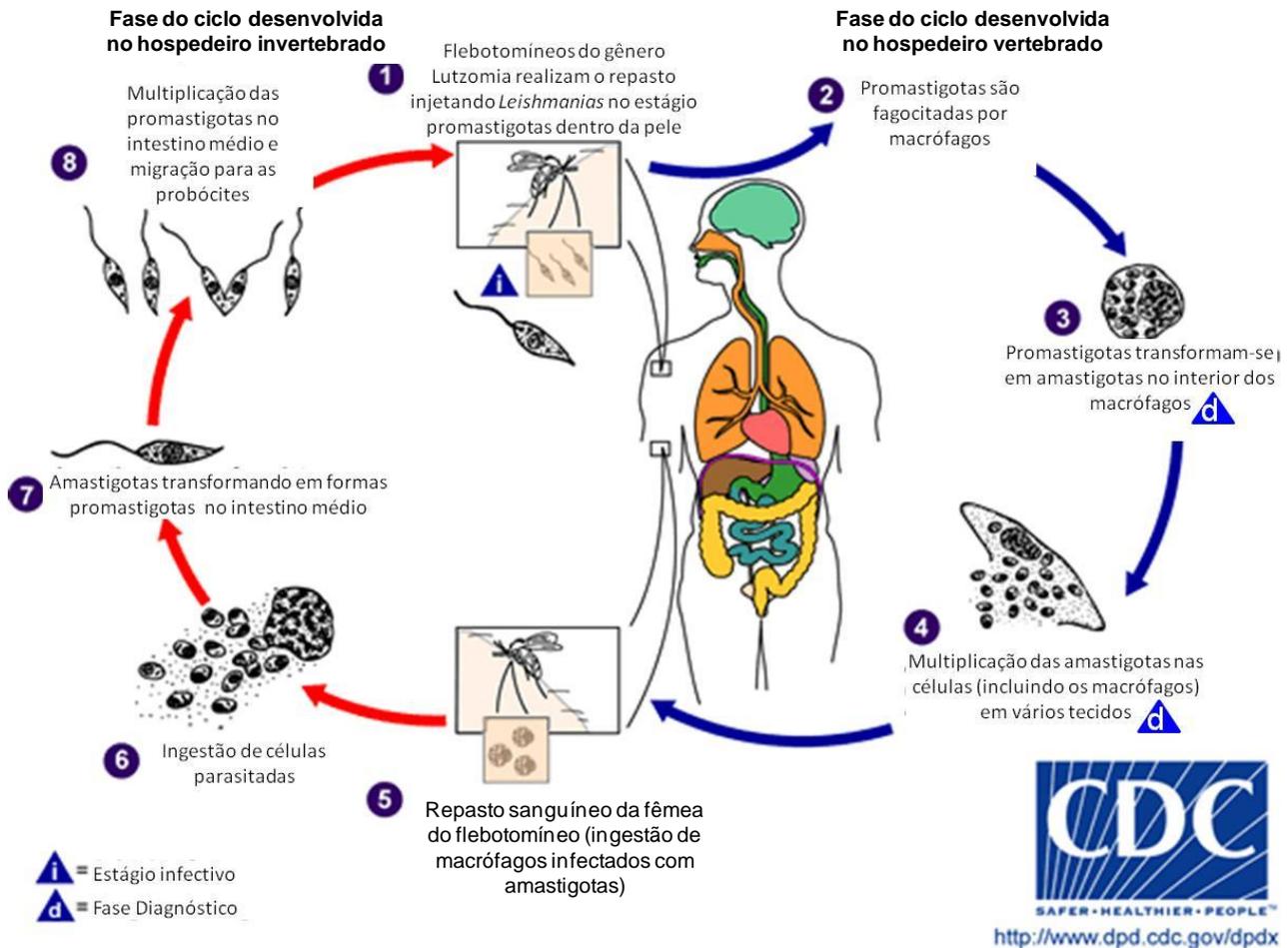


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania sp* no interior do hospedeiro vertebrado e invertebrado. *Figura adaptada do site do CDC – www.dpd.cdc.gov/dpdx*

2.2 - Mecanismos de Interação entre Macrófagos e *Leishmania*

As primeiras células a serem recrutadas para o sítio da lesão após a infecção da *Leishmania* são os neutrófilos. Recentemente, foi sugerido que estas células alberguem a *Leishmania* no início da infecção. Estudos realizados em camundongos demonstraram que neutrófilos são as células predominantemente recrutadas e infectadas nos estágios iniciais da infecção cutânea por *L. major*, e que a depleção dos neutrófilos promove maior resistência do hospedeiro a uma nova infecção (Muller, van Zandbergen et al. 2001; Peters, Egen et al. 2008). Um ponto crítico na interação do parasito com o hospedeiro

está relacionado com os mecanismos de evasão da proteção do sistema imunológico inato. A habilidade de evitar a ação por mecanismos efetores humorais, como a lise pelo sistema do complemento, é fundamental para o parasito, especialmente os protozoários intracelulares, que devem ser resistentes a morte por enzimas lisossomais e metabólicos tóxicos, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS). Estudos também sugerem que os protozoários são capazes de modificar a apresentação de antígenos e, assim, funções imunoreguladoras em células dendríticas e macrófagos, como tentativa de escapar da ação das células da imunidade inata e adaptativa (Sacks and Sher 2002; Ribeiro-Gomes, Peters et al. 2012).

Desta forma, a interação entre alguns protozoários e as células do hospedeiro é particularmente intrigante, porque, apesar dos macrófagos não serem as únicas células capazes de desempenhar uma importante atividade microbicida, os macrófagos são capazes de apresentar antígenos e orquestrar a resposta imune frente a infecções, especialmente por *Leishmania sp.* Assim, para iniciar com sucesso uma infecção por parasitos, este deverá infectar macrófagos, bem como suportar ou contornar as funções de degradação e de ação leishmanicida. Desta forma, os macrófagos são as principais células infectadas na leishmaniose.

Durante a infecção dos macrófagos por promastigotas de *Leishmania*, ocorre a denominada “fase silenciosa” da doença, em que moléculas determinantes para a invasão e estabelecimento da infecção atuam evitando a ativação da célula hospedeira (Chang and McGwire 2002; Halstead, Mahalingam et al. 2010). No entanto, para que ocorra a propagação do parasito, as formas amastigotas replicadas nos macrófagos precisam infectar novas células, sendo este fato crucial para o desenvolvimento da doença, uma vez que um número pequeno de *Leishmania* é inoculado durante o repasto do vetor (aproximadamente 1000 parasitos) (Rogers, Ilg et al. 2004).

Desta forma, o macrófago possui dois papéis principais em infecções por parasitos intracelulares. O primeiro deles é atuando como uma importante célula efetora no controle e morte intracelular do parasito que ocorre pela produção de mecanismos oxidativos (produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio), e não oxidativos (como a produção de citocinas, como TNF e IL-12) (Bogdan and Rollinghoff 1999). Ao mesmo tempo, o outro papel desempenhado pelos macrófagos é de servir como célula hospedeira para o parasito, facilitando sua replicação e sobrevivência, protegendo-os de componentes tóxicos presentes no meio extracelular (Bogdan and Rollinghoff 1999).

As principais moléculas citotóxicas produzidas pelos macrófagos são as ROS e RNS. Os macrófagos produzem maiores quantidades de ROS que os neutrófilos, e a produção de NO nessas mesmas células ocorre em resposta a produção de IFN- γ e TNF e ativação de TLR após ligação de PAMP. Todos esses sinais de ativação induzem a expressão de iNOS (Marcato, Ferlini et al. 2008; Horta, Mendes et al. 2011).

Estudos realizados com *L. major* ou com componentes celulares da membrana plasmática, os lipofosfoglicanos (LPG), demonstraram que o tratamento prévio à infecção induz uma alta liberação de NO pelos macrófagos. No entanto, esse estudo demonstra que quando o IFN- γ é adicionado às culturas de macrófagos após a infecção, ocorre o inverso, havendo uma diminuição da produção de NO (Proudfoot, Nikolaev et al. 1996). Desta forma, no estágio de maturação dos macrófagos, o parasito e os componentes da membrana sofrem modulação positiva ou negativa na indução de iNOS por IFN- γ , dependendo das condições de estímulo.

Apesar da cura clínica, o parasito permanece latente no hospedeiro. A resistência à infecção por *L. major*, por exemplo, é mediada pelas citocinas IFN- γ , TNF, e pela ativação e produção de NO por macrófagos (Horta, Mendes et al. 2011).

O parasito também possui como característica a capacidade de evitar/prevenir a apoptose dos macrófagos. As promastigotas de *L. donovani* ou o tratamento com LPG do parasito, inibem a apoptose em macrófagos murinos após depleção do fator de estimulação de colônia (CSF). Esse efeito foi observado quando houve a adição de TNF e GM-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos). Ambas citocinas são induzidas nos macrófagos após a infecção por *Leishmania*, protegendo as células infectadas ou não da indução de apoptose (Getti, Cheke et al. 2008).

A resposta inflamatória inicialmente estabelecida é essencial para a resolução da infecção. Tipos diferentes de citocinas modulam a reação inflamatória, participando como mediadores da resposta imunológica, ativando-a e, muitas vezes, controlando-a (Stolpen, Pober et al. 1988).

Outra importante linha de proteção inicial contra as infecções por *Leishmania* são as vias de sinalização dos receptores do tipo Toll (TLR). Os TLR foram originalmente identificados em *Drosophila*, como receptores essenciais para o estabelecimento do padrão dorso-ventral no desenvolvimento do embrião. Subsequentemente, homólogos dos receptores do tipo Toll foram identificados em mamíferos e chamados de receptores do tipo Toll (TLR). A família TLR é composta por 11 membros (Akira and Takeda 2004; Akira and Takeda 2004).

Os TLR são receptores que reconhecem moléculas conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), iniciando uma via de sinalização no domínio Toll/IL-1R (TIR) citoplasmático dos TLR. O passo seguinte dessa via de sinalização é executado por uma molécula adaptadora chamada MyD88 (proteína de diferenciação mielóide 88) (Medzhitov and Janeway 1998). No entanto, a sinalização via MyD88 não é compartilhada por todos os TLR, uma vez que TLR4 e TLR3 podem sinalizar via adaptador contendo domínio TIR e indutor de IFN- γ (TRIF) (Pasare and Medzhitov 2005; Gazzinelli and Denkers 2006).

Além de MyD88, tem sido descrita uma outra via de sinalização conhecida como via independente de MyD88 e que utiliza os adaptadores TRIF e TRAM (molécula adaptadora relacionada à TRIF) na sinalização culminando em resultados distintos daqueles da via dependente de MyD88 (Akira and Takeda 2004; Yamamoto and Akira 2004). As vias de sinalização dependentes ou não de MyD88 podem levar a liberação do NF- κ B, com posterior translocação deste para o núcleo levando a transcrição e síntese de citocinas pró-inflamatórias (Takeda and Akira 2004).

Estudo realizado por Marcato e colaboradores (2008) mostraram em macrófagos que a produção de ROS é dependente dos receptores TLR2 e TLR4 na presença de bactéria prevalentes no canal radicular dos dentes, e por *F. nucleatum*, além de induzir uma grande produção de NO independente de TLR2 e TLR4 (Marcato, Ferlini et al. 2008). Outro estudo realizado em *T. cruzi* demonstrou que TLR2 e TLR9 auxiliam no controle da replicação do parasito e que TLR9 possui um papel importante na indução da síntese de IL-12/IFN- γ de forma dependente de MyD88 durante a infecção por esse protozoário (Bafica, Santiago et al. 2006).

No que se refere à expressão de TLR na leishmaniose, poucos são os estudos encontrados na literatura. Um estudo experimental revelou que TLR2, 4 e 9 contribuem para o reconhecimento de *L. major* e subsequente resposta imunológica (Tuon, Amato et al. 2008). Esses autores também realizaram experimentos *in situ* em lesões de pacientes da região do Amazonas infectados por *L. braziliensis* e a expressão dos receptores TLR2, 4 e 9 são quase nulas em relação aos controles sadios com a pele sem lesão (Tuon, Fernandes et al. 2010).

Um estudo realizado em camundongos nocaute para TLR2, 4 e 9 demonstrou que os animais nocautes para TLR9 eram mais susceptíveis a infecção por *L. major*, e que o DNA dessa mesma espécie de *Leishmania* é capaz de induzir a sinalização de TLR9 em

células dendríticas, induzindo, conseqüentemente uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ (Abou Fakher, Rachinel et al. 2009)

Esses resultados sugerem que o parasito promove alterações na expressão dos TLR, no entanto, a forma como isso ocorre e o objetivo ainda não estão bem estabelecidos, sendo necessário mais estudos.

2.3. Tratamentos Quimioterápicos na Leishmaniose

A busca de novas terapias para o tratamento da leishmaniose tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que a resistência do parasito ao tratamento convencional leva a um aumento no tempo de uso do medicamento pelo paciente, e, conseqüentemente, eleva a sua toxicidade (Grogl, Thomason et al. 1992; Mattner, Schindler et al. 2000).

O tratamento da leishmaniose é baseado na utilização dos antimônios pentavalentes, como estibogluconato de sódio e N-metilglucamina. No Brasil, faz-se uso do medicamento Glucantime®, tendo como princípio ativo o antimoniato de N-metilglucamina. Outro medicamento distribuído pelo Ministério da Saúde e utilizado para tratamento de LC e LV como uma segunda opção é a anfotericina B, cujo um dos nomes comerciais é Anforicin B® (Cristália, Itapira, SP, Brasil). O Glucantime® tem sua venda proibida em drogarias e farmácias no Brasil, no entanto, assim como a anfotericina B, estes são disponibilizados gratuitamente a população após diagnóstico da leishmaniose e prescrição médica. Os medicamentos acima citados, são utilizados tanto para o tratamento da LV quanto da LC ou LMC. A dose de antimoniato e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos (Pelissari DM 2011; Saúde 2012).

Além desses dois medicamentos, em alguns casos, outras drogas como pentamidina e paromomicina são utilizadas como segunda opções em casos de resistência e intolerância ao tratamento padrão, e presença de co-morbidades associadas que impossibilitam a utilização das drogas convencionais (Santos, Coutinho et al. 2008).

Ainda não é bem estabelecido o modo de ação dos antimônios pentavalentes. Sabe-se que seu efeito é devido à conversão de um composto relativamente inerte na forma pentavalente para uma forma trivalente mais tóxica (Serenio and Lemesre 1997; Sereno, Cavaleyra et al. 1998). Embora componentes antimônios trivalentes sejam tóxicos tanto para as formas amastigotas e promastigotas da *Leishmania*, apenas as formas amastigotas são susceptíveis ao tratamento com antimônio pentavalente (Serenio,

Cavaleyra et al. 1998; Ephros, Bitnun et al. 1999). Sereno e colaboradores (1998) demonstraram que a maior susceptibilidade a morte do parasito na forma amastigota ocorre no interior dos macrófagos infectados do hospedeiro vertebrado, assim, a droga apresenta resultados positivos em células infectadas, e não em culturas isoladas do parasito (Sereno and Lemesre 1997; Sereno, Cavaleyra et al. 1998)

Embora o uso destas drogas apresente uma série de inconvenientes, como a administração diária por doses intramusculares ou intravenosas, eventual hospitalização para o tratamento, efeitos colaterais graves e tratamento prolongados, não há quimioterápicos com ação leishmanicida equivalente (Denton, McGregor et al. 2004).

Estudos com outros compostos imunomoduladores como a pentoxifilina, um inibidor de TNF, e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) tem sido associado ao Glucantime® no tratamento da leishmaniose cutânea e mucocutânea com bons resultados. Estudos demonstram que pacientes tratados com GM-CSF e antimônio foram curados mais rapidamente do que pacientes tratados somente com antimônio (Almeida, Brito et al. 2005). Utilizando a pentoxifilina, foi demonstrado que sua associação com antimônio promoveu a cura das lesões em 90 dias após a terapia com completa reepitelização do tecido mucoso em 9 dos 10 pacientes submetidos ao tratamento (Lessa, Machado et al. 2001; Machado, Lessa et al. 2007). Desta forma, a associação dos medicamentos foi mais eficaz que a terapia com o antimônio isoladamente.

Diante desse contexto, a busca por novas terapias alternativas é crescente, principalmente por compostos naturais, ou com baixos efeitos colaterais, seja para atuar isoladamente ou como adjuvante do tratamento convencional. As naftoquinonas são produtos naturais encontradas em diversos tipos de plantas, e têm sido estudadas devido seus diversos efeitos no sistema imunológico. Outro composto imunomodulador, a N-acetilcisteína, também se apresenta como candidato no tratamento da leishmaniose. Ambos compostos serão descritos a seguir.

2.3.1. Naftoquinonas - DT.15

As naftoquinonas fazem parte de uma classe de produtos naturais conhecidas como quinonas. As naftoquinonas são compostos dicetônicos derivados do anel naftaleno, onde possuem dois grupos carbonílicos que quando estão nas posições 1,2 do anel naftaleno são chamadas de *orto*-naftoquinonas e quando nas posições 1,4 de *para*-naftoquinonas.

As naftoquinonas, de modo geral, são substâncias que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como: antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, leishmanicidas e anti-inflamatórias (Lisieux 1998; Lima, Correia et al. 2004; Yamashita, Kaneko et al. 2007; Lira, Sester et al. 2008; Coelho, Silva et al. 2010; da Cunha-Junior, Pacienza-Lima et al. 2011).

As naftoquinonas ocorrem naturalmente em plantas superiores das famílias Bignoniaceae, Droseraceae, Lythraceae, Juglandaceae, Plumbaginaceae, Boraginaceae, Ebanaceae, entre outras (BALULA *et al*, 2009). As plantas que possuem estas quinonas são utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças. Dentre as naftoquinonas naturais, muitos estudos foram realizados com o lapachol. O principal interesse no lapachol está relacionado com a capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, o ânion-radical superóxido e o radical hidroxila.

O mecanismo de ação das naftoquinonas nos sistemas biológicos ainda não foi totalmente esclarecido. Sabe-se que parte do mecanismo envolve a geração de ROS induzidas pela biorredução do núcleo quinônico por enzimas específicas e oxigênio (Benites, Valderrama et al. 2008).

Na literatura há alguns estudos que avaliam a atividade das naftoquinonas em doenças infecciosas causadas por protozoários, incluindo as leishmanioses. Cunha-Júnior e colaboradores (2011) demonstraram atividade leishmanicida da molécula híbrida LQB-118 proveniente da reação química entre uma naftoquinona e um pterocarpano *in vivo* em BALB/c infectados por *L. amazonensis* (da Cunha-Junior, Pacienza-Lima et al. 2011). Outro estudo envolvendo hidroxiquinonas demonstrou que um dos derivados avaliados mostrou atividade leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo* contra *L. amazonensis* e *in vitro* contra *L. braziliensis*, apresentando baixa toxicidade para macrófagos (Lima, Correia et al. 2004).

Ali e colaboradores (2011) avaliando naftoquinonas, também demonstraram que nenhum dos compostos testados foi capaz de induzir a produção de NO pelos macrófagos, excluindo a ativação de mecanismos microbicidas nessas células. Além disso, esse estudo evidenciou que os membros oxigenados no anel quinona possuem ação leishmanicida quando co-incubados com a glutatona em um dos compostos estudados, enquanto que a maioria dos compostos restantes perdia a atividade (Ali, Assimopoulou et al. 2011).

No entanto, alguns compostos apresentam toxicidade em células de mamíferos, mesmo apresentando atividade leishmanicida. Um estudo utilizando um painel de células humanas (linhagens de células de cancer - KB, SKMel, A549, MDA) e de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (BMMPHi), demonstrou que compostos com atividade leishmanicida apresentavam efeitos tóxicos (de leve a moderados), induzindo a morte celular (Kayser, Kiderlen et al. 2000).

A naftoquinona utilizada nesse estudo foi extraída da planta *Kigelia africana*, da família das Biognoniaceae, da série Pinnatal, e foi desenvolvida pelo pesquisador Jeremiah Malerich do centro de pesquisa SRI International, em Menlo Park, na Califórnia, EUA. A estrutura bi-dimensional do composto original, bem como do composto final utilizado nessa tese estão representados na figura 2. Esse pesquisador sintetizou previamente, naftoquinonas da mesma série que apresentam a atividade antimalárica (Malerich, Maimone et al. 2005). Cabe ressaltar que a naftoquinona utilizada para os testes será denominada ao longo do trabalho como droga teste 15 (DT.15)

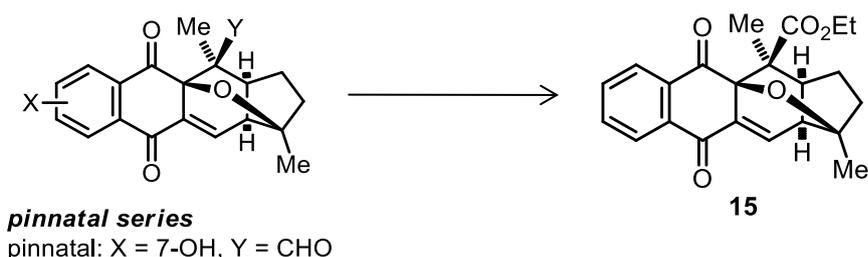


Figura 2: Estrutura química bidimensional da naftoquinina denominada droga teste número 15 (DT.15).

Apesar dos diversos estudos com naftoquinonas envolvendo doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, poucos são os trabalhos realizados com as naftoquinonas da série pinnatal, e extraídos de *Kigelia africana*, seja das folhas, flores ou frutos. Um estudo dos componentes dos frutos de *K. pinnata* foi realizado para identificar compostos com atividade inibidora do crescimento de células de melanoma humano e demonstrou

citotoxicidade *in vitro* contra células de melanoma humano, especialmente as furonaftoquinonas, que apresentaram efeito citotóxico em duas linhagens celulares de câncer de mama humano (Higgins, Bell et al. 2010).

Além da DT.15, outro composto está sendo investigado com o intuito de atuar como adjuvante ao tratamento padrão, seja reduzindo as doses do medicamento ou seu tempo de exposição. A N-acetilcisteína (NAC) não apresenta toxicidade celular, sendo um candidato terapêutico interessante.

2.3.2. N-Acetilcisteína e Suas Propriedades

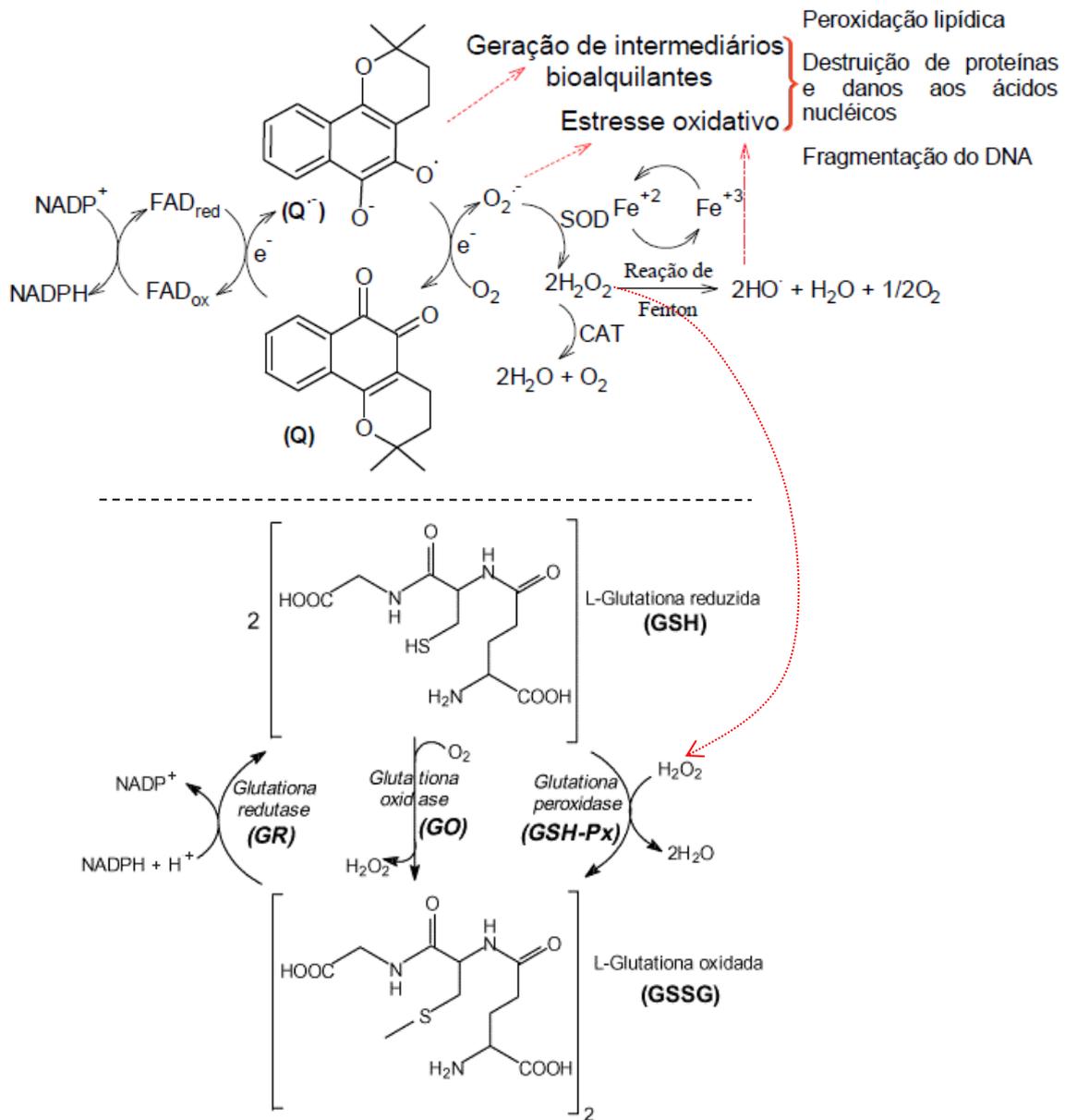
Muitas doenças têm seu surgimento a partir da perda do balanço entre mecanismos de proteção antioxidantes e produção de espécies reativas com alto potencial oxidante no interior das células, causando assim o estabelecimento do processo imunopatogênico.

A NAC é um precursor da glutathiona, e possui aplicação clínica há mais de 30 anos, sendo utilizada inicialmente como agente mucolítico e protetor renal após o uso de contrastes para exames de imagens. No entanto, seu crescente estudo deve-se ao fato de possuir ações imunomoduladoras, atuando diretamente nos níveis de GSH e no estresse oxidativo em infecções por HIV, câncer e doenças cardíacas (Kelly 1998).

Um dos principais mecanismos de ação da NAC envolve o processo de formação/captação de ROS. A glutathiona reduzida (GSH) está envolvida com a proteção das células a danos oxidativos devido ao seu papel na redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e devido à sua capacidade de inativar radicais livres pela doação de elétrons ao radical. Estes processos resultam na oxidação de GSH em glutathiona oxidada (GSSG). GSSG e GSH podem ser interconvertidas, via reação da glutathiona redutase, que utiliza $NADP^+/NADPH$ como oxidante/redutor; portanto, a GSH exerce um papel na manutenção do estado redox celular (Figura 3) (Silva 2012).

Para exemplificar a ação da GSH, além das outras duas enzimas responsáveis pela neutralização das ROS, a figura 3 demonstra a geração de radicais a partir de um substrato quinônico. Esse substrato (Q) passa por uma biorredução na presença da coenzima NADPH, dentre outras, formando pelo ganho de um elétron a espécie ânion-radical semiquinona ($Q\cdot^-$) *in situ*. O ânion-radical semiquinona formado ($Q\cdot^-$) na presença de oxigênio se oxida, transferindo um elétron, gerando o ânion-radical superóxido ($O_2\cdot^-$). Por sua vez, o ânion-radical superóxido ($O_2\cdot^-$) sofre a ação da enzima superóxido

dismutase gerando H_2O_2 . Essa espécie reativa potencial pode ser neutralizada pela ação de duas enzimas: a catalase e a GSH. Nota-se que outras ROS podem ser geradas paralelamente, como em uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} com a produção do radical hidroxila (HO) (Figura 3) (Silva 2012).



CAT = Enzima catalase; **FAD** = Flavina adenina dinucleotídeo; **NADP** = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; **SOD** = Enzima superóxido dismutase

Figura 3: Formação de espécies reativas de oxigênio no ciclo redox das quininas em conjunto com o ciclo redox da glutatona.

Adaptada de <http://bioquimicadanutricao.blogspot.com.br/2011/06/selenio.html> e Silva (2012).

Uma importante característica da NAC é ser rapidamente absorvida, por ser uma molécula pequena (Figura 4), e tolerada quando administrada por via oral, sendo rapidamente absorvida por células da mucosa estomacal e intestinal, atingindo o sistema portal e fígado. Sabe-se que uma pequena quantidade de moléculas de NAC atinge a corrente sanguínea, sendo detectada no plasma e subsequentemente nos tecidos, tendo uma meia-vida de 2,15 horas, podendo ser detectada até 12 horas após a administração oral (De Caro, Ghizzi et al. 1989).

A NAC também fornece suporte a síntese de GSH quando há uma maior demanda na produção da mesma, como quando no metabolismo de acetaminofeno (paracetamol) (Burgunder, Varriale et al. 1989), corrige as concentrações de glutathione resultando na preservação da fluidez da membrana plasmática e atividade da catalase, superóxido dismutase mitocondrial e em diferentes formas de glutathione (Pastor, Collado et al. 1997; Kelly 1998)

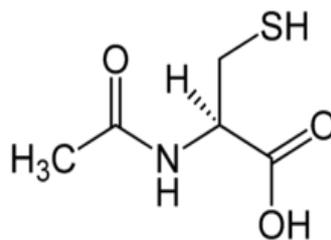


Figura 4: Estrutura química bidimensional da N-acetilcisteína.

Evidências *in vivo* e *in vitro* indicam que a NAC eleva a biossíntese da glutathione reduzida (GSH), aumentando a atividade da glutathione S-transferase, tendo efeitos benéficos nos mecanismos antioxidantes, na promoção da detoxificação, na hepatoproteção, na redução dos níveis de lipoproteínas circulantes, dentre outros efeitos (Kelly 1998; Atkuri, Mantovani et al. 2007). Em infecções por HIV, em modelos animais, experimentos *in vitro* demonstraram que NAC causa a proliferação de esplenócitos e protege linfócitos contra a citotoxicidade induzida por agentes mitogênicos (Omara, Blakley et al. 1997). Ainda em HIV, evidências sugerem que a NAC melhora a resposta imune de linfócitos T do sangue periféricos de humanos, tornando-os mais responsivos as células infectadas (Breithaupt, Vazquez et al. 1996). No entanto, mais estudos em humanos são necessários, devido a diversidades de efeitos terapêuticos descritos na literatura.

Uma importante característica observada quando aprofunda-se no estudo da NAC é seu efeito paradoxal encontrado de acordo com a doença e modelo estudado, tendo

como exemplo seu efeito hepatoprotetor com redução da ação oxidante na fibrose cística (Tirouvanziam, Conrad et al. 2006; Atkuri, Mantovani et al. 2007), e sua ação pro-inflamatória com o aumento de NO em infecções por *Leishmania*. Nosso grupo demonstrou que, durante a infecção por *L. major*, os camundongos alimentados com NAC apresentaram redução no tamanho da lesão e melhora nos parâmetros inflamatórios, com aumento de TNF e produção de NO pelos macrófagos (Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003). Monteiro e colaboradores também demonstraram redução na carga parasitária em camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento por via oral com NAC (Monteiro, Marques et al. 2008).

A NAC também foi utilizada como adjuvante no tratamento de malária em humanos, no entanto, efeitos benéficos não foram encontrados após a utilização de altas doses intravenosas de NAC concomitantemente com o tratamento convencional (Charunwatthana, Abul Faiz et al. 2009).

No entanto, os mecanismos celulares envolvidos com o sucesso desses tratamentos não são bem estabelecidos. Compreender como essa droga atua do ponto de vista celular é fundamental, uma vez que este conhecimento poderá nortear a busca de novas estratégias na prevenção ou tratamento, que direcionem a resposta imunológica para um perfil de cura, nesse caso, da leishmaniose.

Assim, a hipótese deste trabalho é determinar quais são as características fenotípicas e funcionais dos monócitos humanos após a infecção por *Leishmania*, e como se comportam como modelo de infecção *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania* durante os tratamentos com drogas de ação leishmanicida e imunomoduladoras.

3.0 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Caracterizar e avaliar a resposta imune inata de monócitos humanos provenientes de células mononucleares do sangue periférico após a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, *in vitro*, e tratados ou não com drogas com possíveis ações leishmanicidas.

3.2 - Objetivos Específicos

3.2.1 – Objetivos Específicos - 1ª Parte

- Avaliar a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD40, CD86, CD11b, HLA-DR e CD16), como também a produção intracelular das citocinas (TNF, IL-12 e IL-10) e do receptor do tipo Toll 9 (TLR9) em monócitos CD14⁺ provenientes de CMSP de pacientes infectados por *L.braziliensis* e de indivíduos não infectados em diferentes condições de cultura celular por citometria de fluxo.
- Avaliar a existência de correlações entre as variáveis: produção de citocinas, TLR9, moléculas co-estimuladoras e os dados clínicos como área da lesão.

3.2.2 - Objetivos Específicos - 2ª Parte

- Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* da droga teste número 15 (DT.15) e N-acetilcisteína (NAC) em culturas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) e *L. major* (WHO MHOM/IL/ 80/Friedlin), por análises de:
 - Crescimento e proliferação dos parasitos por contagem em câmara de Neubauer e diluição limitante após cultura com as drogas anfotericina B e DT.15, bem como do Glucantime®, em conjunto ou não com NAC.

- Morte celular nas diferentes espécies de *Leishmania* pela marcação da fosfatidilserina e fragmentos de DNA após o tratamento com as drogas anfotericina B e DT.15; e Glucantime®, em conjunto ou não com NAC.
- Proliferação celular após cultura com as drogas anfotericina B e DT.15 nas diferentes espécies de *Leishmania* coradas por CFSE.
- Avaliar características fenotípicas e funcionais na infectividade e morte celular, *in vitro*, de monócitos provenientes de CMSP infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46) e *L. major* (WHO MHOM/IL/ 80/Friedlin) após tratamento com as drogas DT.15 e NAC, analisando a:
 - Taxa de morte nos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* ou não pelas diferentes espécies de *Leishmania* pela marcação de fosfatidilserina e fragmentos de DNA, após tratamento com anfotericina B, Glucantime®, em conjunto ou não com NAC, e DT.15 por citometria de fluxo.
 - Infectividade dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania* coradas com CFSE, por citometria de fluxo, após o tratamento com anfotericina B, Glucantime®, em conjunto ou não com NAC, e DT.15.
 - Expressão de moléculas co-estimuladoras CD11b, HLA-DR, CD80 e CD86) e citocinas (TNF, IL-10, IL-6 e IL-12) nas subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania*, e tratados com anfotericina B, Glucantime®, em conjunto ou não com NAC, e DT.15 por citometria de fluxo.

4.0- MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos, e os resultados apresentados nessa tese foram divididos em duas partes independentes para facilitar sua organização. A primeira parte representa a avaliação imunofenotípica de monócitos presentes no sangue periférico de pacientes infectados por *L. braziliensis*, denominada Parte 1.

A segunda parte foi referente ao tratamento com drogas de ação leishmanicida tanto na ação direta aos parasitos, como nos experimentos em modelos de infecção *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania* em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis. Nos resultados obtidos na segunda parte da tese foram avaliados o efeito leishmanicida da droga teste número 15 (DT.15), subdividida na parte 2-A, bem como da N-acetilcisteína (NAC), subdividida na parte 2-B.

4.1 – Material e Métodos - Parte 1 - Avaliação Imunofenotípica de Monócitos CD14⁺ Presentes no Sangue Periférico de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

4.1.1 - Indivíduos

Para análise da primeira parte desse trabalho, coletou-se o sangue periférico de indivíduos diagnosticados com leishmaniose cutânea por infecção por *L. braziliensis* residentes em área endêmica da doença, ainda não tratados com Glucantime®. Todos esses indivíduos, denominados pacientes neste estudo, são provenientes da área endêmica do distrito de Corte de Pedra, da cidade Tâncredo Neves, localizada a aproximadamente 275 km de Salvador, Bahia.

Os pacientes que recorreram aos centros de coleta receberam tratamento, participando ou não deste estudo. O diagnóstico da leishmaniose foi baseado na presença de lesões dermatológicas, história clínica e intradermoreação de Montenegro positiva para antígenos de *Leishmania*.

Todos os procedimentos envolvendo pacientes realizaram-se sob a coordenação do Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, do Hospital Universitário Professor Edgar Santos – HUPES (UFBA), sob aprovação nacional da CONEP, # 1583/2002, IRB 00004123. O sangue dos indivíduos não infectados por *L. braziliensis*, caracterizados

como controle negativo para leishmaniose, foi obtido de doadores voluntários e não residentes em áreas endêmicas para leishmaniose da cidade de Belo Horizonte, MG.

4.1.2 – Preparação do Antígeno Solúvel de Leishmania - SLA

O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) foi fornecido pelo Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (UFBA/Brasil), pela professora Dr.^a Olívia Bacellar, sendo o antígeno preparado por um método que utiliza congelamento/descongelamento em sua preparação. De forma sucinta, o pellet formado por promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/2001/Jolival) foi lavado utilizando PBS e em seguida ressuspenso em solução de lise contendo tris-HCl (10mM), EDTA (0,1mM) e leupeptina (0,5µg/ml) em PBS (pH 8,0). Ajustou-se o volume utilizado da solução de lise para a concentração final de 10^8 promastigotas/ml. A amostra foi, então, congelada/descongelada em nitrogênio líquido (10 vezes). Após esse procedimento, sonicou-se a amostra (5 ciclos com 30 segundos de intervalo a 40Hz) e o homogenato obtido foi ultracentrifugado (14000 rpm por 30 minutos a 4°C). Em seguida, coletou-se o sobrenadante, que foi filtrado em filtro estéril (membrana de 0.22µm) com baixa afinidade a proteína. A concentração protéica foi medida utilizando o método de Lowry. Todos os antígenos foram titulados utilizando células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea residentes na área endêmica de Corte de Pedra - BA.

4.1.3 - Purificação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

O sangue periférico foi recolhido em tubos a vácuo contendo heparina sódica. Ao sangue foram acrescentadas solução fisiológica contendo fosfato (PBS) (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) no mesmo volume que o do sangue a ser analisado. O sangue acrescido de PBS foi vertido lentamente sobre o Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, USA) contido em tubos plásticos. O volume de Ficoll-Paque utilizado foi o mesmo que o do sangue original. Os tubos com o gradiente de Ficoll foram centrifugados a 1200 rpm, por 40 minutos a temperatura ambiente (entre 18 – 23 °C).

Após a centrifugação, coletou-se o plasma, que foi armazenado em freezer -20°C. O anel de CMSP presente na interface do plasma e o Ficoll-Paque foi coletado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, seguindo de lavagens em PBS a 4°C para remoção de resíduos de Ficoll-Paque. Esses tubos foram lavados e centrifugados

(1200 rpm, por 10 minutos a 4°C) por duas vezes. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspendido em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1mg/mL), 1mM L-glutamina e 10% de soro humano masculino inativado AB Rh⁺, na concentração final de 1x10⁷ células por mL. Todos os reagentes e soluções utilizados para cultura celular foram provenientes da empresa de biotecnologia Sigma Aldrich Chemicals. A viabilidade celular foi avaliada pelo corante intravital azul de Tripán (diluição das células em corante 1:20 v/v) seguido de contagem em câmara de Neubauer.

Após contagem, as células foram imunofenotipadas para a condição *ex vivo* e também submetidas à cultura na presença ou ausência do estímulo SLA.

4.1.4 – Marcação de Moléculas de Superfície de Monócitos

As CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea e dos controles não infectados foram imunofenotipadas após diferentes condições de cultura: CMSP coletadas a fresco (*ex vivo*), células mantidas em cultura com meio RPMI completo (Meio), e células mantidas em cultura como meio RPMI completo acrescido de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). Após a coleta a fresco ou cultura celular na presença ou ausência do estímulo, incubaram-se as mesmas com anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ou Cychrome (Cy) por 20 minutos a 4° C.

Após marcação, as amostras foram lavadas por centrifugação de 10 minutos a 4°C com PBS e fixadas por incubação à temperatura ambiente por 20 minutos com 200 µL de PBS com 2% formaldeído (Sigma Aldrich), e mantidas a 4° C até a aquisição no citômetro de fluxo (FACScalibur e BD FACSCanto II – Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). Os mAbs utilizados para a marcação foram controles de isotipo conjugados com FITC (FL-1), PE (FL-2) e Cy (FL-3) e anti-CD14, anti-CD16, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-CD11b e anti-HLA-DR conjugados com FITC, PE ou Cy, provenientes das empresas eBioscience (San Diego, CA, USA) e BDbioscience (San Jose, CA, USA).

Para a aquisição (30000 eventos na região R1 de monócitos – Figura 5), armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular, empregou-se um citômetro de fluxo equipado com sistema de computador contendo o software CellQuest™ ou BD FACSDiva™ 6.0 software (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA).

Analisaram-se os dados obtidos utilizando o programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star (Ashland, OR, USA).

4.1.5 – Marcação Intracelular de Citocinas em Monócitos

Para avaliar o padrão de citocinas na população de interesse, cultivou-se aproximadamente $2,5 \times 10^5$ CMSP por 20 horas em placas de 96 poços, com 200µl de meio RPMI completo na presença ou não do SLA. Durante as últimas 4 horas de cultura das CMSP adicionou-se 1 µg/ml de brefeldina A (eBioscience) aos poços. Após centrifugação (1200 rpm, 10 minutos a 4°C), as células foram marcadas com mAb anti-moléculas de superfície (como descrito no item 4.1.3) e fixadas em solução de PBS e 2% formaldeído. Após fixação, as células foram lavadas com PBS contendo 0,5% de albumina do soro bovina (BSA) e, posteriormente permeabilizaram-se as células com solução de saponina (0,5% em PBS), incubando-as com mAb conjugados com PE (TLR9, IL-10, IL-12 e TNF) (eBioscience) por 30 minutos a 4° C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes, fixadas e adquiridas utilizando um citômetro de fluxo (FACScalibur e BD FACSCanto II – Becton, Dickinson and Company).

Para a aquisição (30000 eventos na região R1 de monócitos – Figura 5), armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular, empregou-se um citômetro de fluxo equipado com sistema de computador contendo o software CellQuest™ ou BD FACSDiva™ 6.0 software.

4.1.6 – Estratégia de Análise

Após aquisição das amostras, analisaram-se os dados obtidos com auxílio do programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star. Realizaram-se avaliações do perfil celular da amostra, com relação ao tamanho e a granulosidade das CMSP, selecionando a região R1 dos monócitos (Figura 5).

A identificação da população celular de interesse foi confirmada através dos gráficos de intensidades de fluorescências, com seleção das células CD14⁺ para os monócitos provenientes de CMSP *versus* a granulosidades (SSC). Após a seleção dessa segunda população localizada da região R2, construíram-se histogramas para quantificação do segundo marcador, seja moléculas de ativação presentes na superfície

dos monócitos (CD11b, CD16, CD40, CD80, CD86 e HLA-DR), citocinas intracelulares (IL-10, IL-12 e TNF) ou o receptor intracelular TLR-9 (Figura 5).

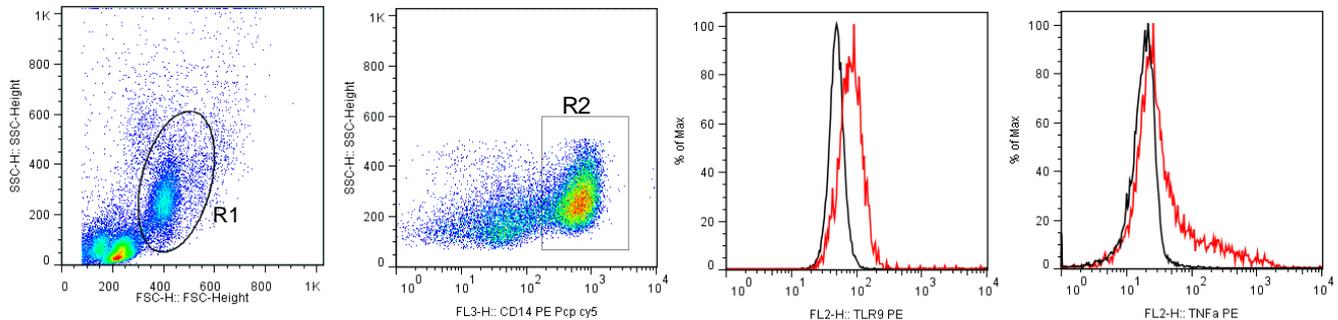


Figura 5: Estratégia de análise utilizada para seleção de monócitos CD14⁺ expressando TLR9 e a citocina TNF em pacientes com leishmaniose cutânea.

CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea foram marcadas e analisadas utilizando-se um citômetro de fluxo. Gráficos de pontos demonstraram a população de monócitos selecionados (Região R1) de acordo com os parâmetros morfológicos tamanho e granulosidade (FSCxSSC). Após a primeira seleção, construíram-se gráficos de granulosidade (SSC) *versus* a expressão de CD14, com a seleção dos monócitos positivos para a expressão deste marcador (R2). A partir dessa segunda região, avaliou-se a expressão do segundo marcador (exemplificado pelo TNF e TLR9), em gráficos de histogramas para as condições meio (linha preta) e estímulo com SLA (linha vermelha).

4.1.7 - Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software JMP 5.0.1® e GraphPad Prism 3.0.3® (San Diego, EUA). Todos os resultados desse estudo foram submetidos aos testes de outliers e normalidade (teste de Shapiro-Wilk). Aos resultados desse estudo que assumiram distribuição não-paramétrica, aplicou-se o teste de Wilcoxon. Aos dados que assumiram distribuição normal, aplicou-se à análise de variância ANOVA One-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Para análise de variáveis não categóricas (variáveis não paramétricas), realizou-se o teste t de student. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4.2 – Parte 2 - Efeito Leishmanicida de Diferentes Drogas em Culturas de Leishmania e em CMSP Infectadas *in vitro* por Diferentes Espécies de Leishmania

4.2.1 – Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados para os experimentos *in vitro* eram analíticos, com alto grau de pureza, e obtidos das empresas Sigma Aldrich Chemicals e Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY), com exceção de:

1. kit de detecção de apoptose Annexin V- FITC (eBioscience);
2. solução para marcação com iodeto de propídio (propidium iodide staining solution - BDbioscience);
3. kit de proliferação celular CFSE – Ester succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFSE Cell Proliferation Kit - Molecular Probes, Eugene, OR, USA);
4. anfotericina B (Anforicin B® - Cristália, Itapira, SP, Brasil);
5. antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime® - Sanofi-Aventis, Suzano, SP, Brasil);
6. naftoquinona produzida a partir de plantas superiores da família da *Bignoniaceae*, classe pinnatal, denominada, nesse estudo, como droga teste nº.15 (DT.15), e desenvolvida pelo pesquisador Jeremiah P. Malerich do SRI International, Center of Excellence in Infectious Disease and Biodefense (Menlo Park, CA, USA).

A solução estoque de Anforicin B®, Glucantime® e DT.15 foi preparada em dimetilsulfoxido (DMSO), e estocada em freezer a -20°C. A solução estoque de NAC foi diluída em PBS, na concentração estoque de 200mM. Todas as soluções foram feitas em ambiente estéril. Para a realização dos ensaios *in vitro*, as soluções contendo as drogas foram diluídas imediatamente em meio completo Schneider's (Sigma Aldrich Chemicals) ou meio completo RPMI antes do uso seu na cultura celular.

4.2.2 - Cultura de Leishmania

Utilzaram-se as cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e *Leishmania major* (WHO MHOM/IL/ 80/Friedlin) para os ensaios *in vitro*. As promastigotes foram mantidas a 24°C em garrafas de cultura de 25cm³ em meio Schneider's suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma Aldrich Chemicals), sulfato de gentamicina (40µg/ml) (Gibco-Invitrogen), e 2% de urina humana masculina estéril (não comercial). Atingindo a fase estacionária, cerca de 4-6 dias após o repique, coletaram-se as promastigotas para os ensaios *in vitro*.

4.2.3 – Experimentos *in vitro* Realizados com Diferentes Espécies de Leishmania Submetidas ao Tratamento com Anfotericina B e Droga Teste nº.15 – DT.15

As diferentes espécies de *Leishmania* foram tratadas na sua forma promastigota, na fase estacionária, 5-6 dia de cultura. Colocaram-se as promastigotas em cultura em placas de 24 poços, na concentração de 1x10⁶ parasitos/mL. Acrescentaram-se ao meio de cultura as drogas para avaliação da sua ação leishmanicida. As condições de cultura celular e concentração das drogas foram as seguintes:

1. Meio Schneider's completo, grupo **Meio**;
2. Anfotericina B (Anforicin B®) - 1 e 3µM, grupo **Ampho**;
3. Naftoquinona - SRI test drugs number#15 (DT.15) - 3 e 9µM, grupo **DT.15**.

Desta forma, adotou-se como identificação para as condições de cultura meio, anfotericina B e DT.15 as denominações Meio, Ampho e DT.15, respectivamente. Após a adição das drogas, incubaram-se as promastigotas por 24 ou 48 horas, a 24°C ao abrigo da luz. Transcorrido o tempo de cultura, realizaram-se as análises do efeito leishmanicida pelos ensaios descritos nos itens seguintes dessa tese.

4.2.4 – Experimentos *in vitro* Realizados com Diferentes Espécies de Leishmania Submetidas ao Tratamento com Glucantime® e NAC

As diferentes espécies de *Leishmania* foram tratadas na sua forma promastigota, na fase estacionária, 5-6 dia de cultura. Colocaram-se as promastigotas em cultura em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^6 parasitos/mL. Acrescentaram-se ao meio de cultura as drogas para avaliação da sua ação leishmanicida. As condições de cultura celular e concentração das drogas foram as seguintes:

1. Meio Schneider's completo, grupo **Meio**;
2. Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) - 100 e 300µg/ml, grupo **Glu**;
3. Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) - 100 e 300µg/ml juntamente com NAC 5mM, grupo **Glu+NAC**;
4. N-acetilcisteína (NAC) – 2,5; 5; 10 e 20 mM, grupo **NAC**.

Desta forma, adotou-se como identificação para as condições de cultura meio, Glucantime®, Glucantime® associado a NAC e NAC denominações Meio, Glu, Glu+NAC e NAC, respectivamente. Após a adição das drogas, incubaram-se as promastigotas por 24 ou 48 horas, a 24°C ao abrigo da luz. Transcorrido o tempo de cultura, realizaram-se as análises para avaliação do efeito leishmanicida pelos ensaios descritos nos itens seguintes dessa tese.

4.2.5 – Avaliação do Crescimento Celular por Contagem em Câmara de Neubauer

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a atividade leishmanicida após o tratamento com as diferentes drogas (anfotericina B, Glucantime®, DT.15 e NAC), foi a contagem em câmara de Neubauer. Essa técnica consiste na contagem do parasito após fixação em solução fisiológica (PBS) contendo formaldeído (4%). Coletaram-se as promastigotas após incubação por 24 ou 48 horas a 24°C com as drogas, fixando-as em PBS/formaldeído 4%. Utilizou-se o fator diluição 1:20 para esse experimento em todas as contagens. O número de promastigotas vivas foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer após fixação dos parasitos.

4.2.6 - Ensaio de Proliferação e Morte Celular por Diluição Limitante

O ensaio de diluição limitante tem por finalidade avaliar a morte celular e a capacidade de proliferação da *Leishmania* após um determinado tipo de tratamento. Sabe-se, como descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4 dessa tese, que 1×10^6 parasitos/mL foram colocados em cultura, e em seguida submetidos ao tratamento com drogas para avaliação do efeito leishmanicida. Após o tratamento das espécies de *Leishmania* por 24 ou 48 horas, coletou-se o volume corresponde a 2×10^5 parasitos (200 μ l), de acordo com a contagem inicial dos parasitos colocados em cultura na placa de 24 poços, e anterior ao tratamento com as drogas. As promastigotas foram lavadas duas vezes com PBS estéril gelado após centrifugação (3000 rpm, a 4°C, por 15 minutos), ressuspendidas e submetidas ao ensaio de diluição limitante. Inicialmente, adicionou-se ao primeiro poço 2×10^5 parasitos, de acordo com a contagem inicial anterior ao tratamento. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas em 12 replicadas, utilizando uma placa de 96 poços de fundo chato e estéril. A cada poço adicionou-se meio Schneider's completo (200 μ l). A medida que se realizou a diluição, cada poço seguinte recebeu quantidade menor de *Leishmania* que o poço anterior, sendo a razão de diluição de 1:4. O volume final de cada poço foi de 200 μ l, como exemplificado na figura 6. Após as diluições seriadas, as placas foram mantidas em cultura por mais 5 dias a 24°C e ao abrigo da luz. Após 5 dias, visualizou-se cada poço utilizando um microscópio invertido para avaliação do crescimento celular. O número de parasitos foi estimado por relação logarítmica de acordo com a visualização destes em cada poço.

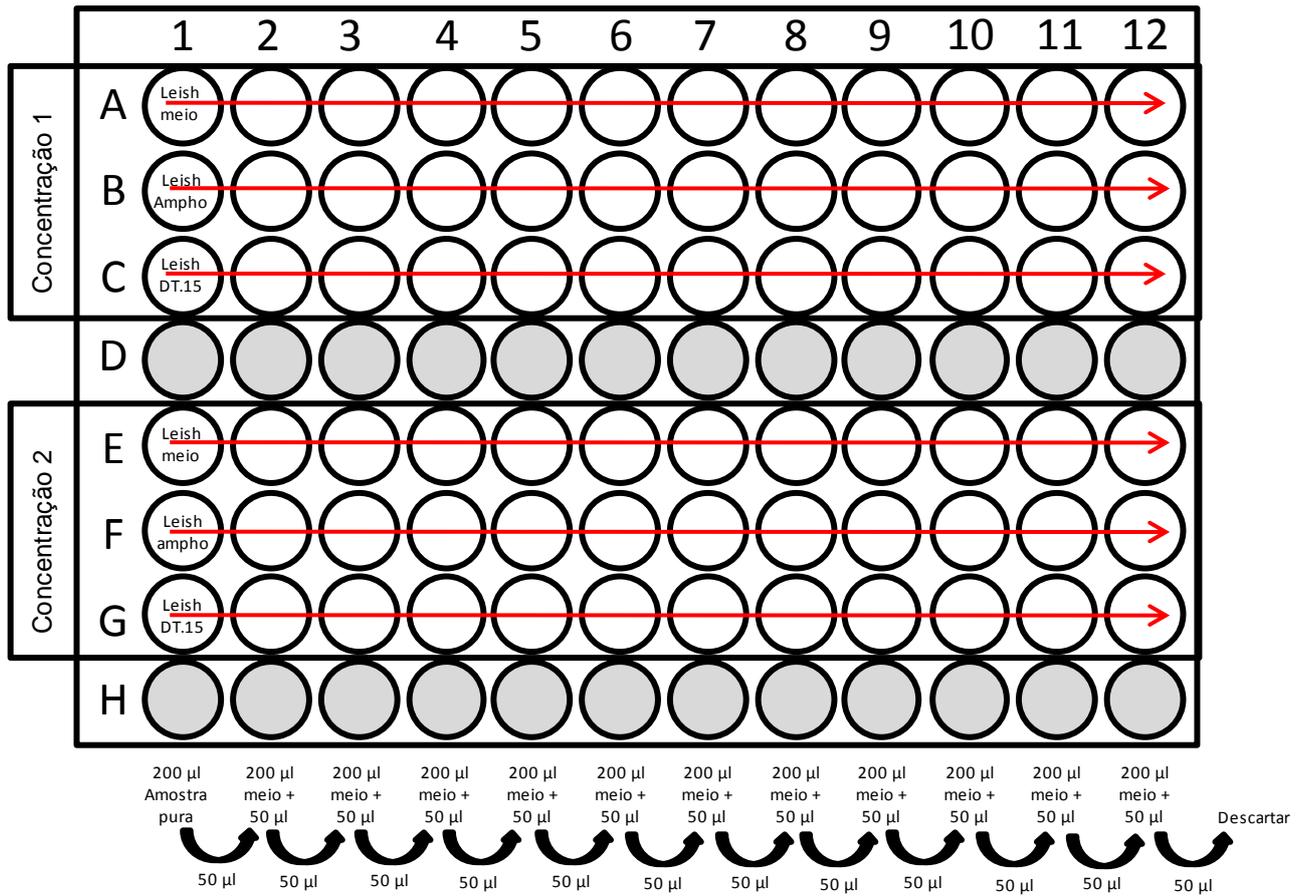


Figura 6: Desenho esquemático do ensaio de diluição limitante.

4.2.7 – Avaliação da Morte da *Leishmania* por Coloração com Anexina V e Iodeto de Propídio

Outra forma de avaliar o efeito leishmanicida das drogas foi a marcação dos parasitos com anexina V e iodeto de propídio (PI), para determinação da morte celular. Inicialmente, após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes em PBS gelado e ressuspensas em solução tampão de ligação (binding Buffer) (eBioscience). Na fase inicial da apoptose, a molécula intracelular fosfatidilserina transloca-se para a membrana extracelular. Uma vez na superfície da membrana, a fosfatidilserina pode ser detectada pelo citômetro de fluxo devido à ligação da anexina V conjugada ao fluorocromo FITC. Desta forma, adicionaram-se os anticorpos anexina V- FITC (eBioscience) diluídos em binding buffer às amostras, com o tempo de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as espécies de *Leishmania* foram lavadas em binding buffer e ressuspensas em 200µl da mesma solução. No momento da aquisição no citômetro de fluxo (FACSCantoll - Becton & Dickinson Company), adicionou-se, no ato da leitura da amostra, 5µl de solução de iodeto de propídio (PI) (BDbioscience). O número mínimo de eventos adquiridos foi de 100000 no gate de *Leishmania* Total. Todas as leituras foram feitas em baixa velocidade (Low). Após aquisição, analisou-se a expressão de anexina V (FL1-FITC) e PI (FL3-PE-Cy5.5) na região de *Leishmania* total utilizando-se o programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star.

4.2.8 – Avaliação da Proliferação Celular por Coloração com CFSE

Os parasitos foram marcados utilizando o corante CFSE para determinação da proliferação das promastigotas de *Leishmania* utilizando-se o citômetro de fluxo, como descrito por Gonçalves e colaboradores (Goncalves, Vieira et al. 2005). De forma sucinta, as promastigotas foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e ressuspensas a uma concentração de 1×10^7 *Leishmania*/ml. A essa amostra, adicionaram-se 2µl de solução estoque (5mM) de CFSE diluída em DMSO (Sigma Aldrich Chemicals) por mililitro de suspensão celular, sendo a concentração final de CFSE equivalente a 10µM. Incubaram-se as promastigotas de *Leishmania* em estufa de CO₂ a 37°C por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de PBS gelado acrescido de 10% de soro bovino fetal inativado (Sigma Aldrich Chemicals). Após lavagem e formação do pellet por centrifugação (3000rpm, 10 minutos a 4°C), ressuspenderam-se as espécies de *Leishmania*

em meio Schneider (Sigma Aldrich Chemicals) completo para os experimentos realizados nas culturas de *Leishmania*; ou em meio RPMI completo para os experimentos realizados no modelo de infecção *in vitro* de monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis.

4.2.9 – Estratégia de Análise para a Avaliação da Morte Celular por Anexina V e Iodeto de Propídio e Proliferação Celular por CFSE nas Diferentes Espécies de *Leishmania*

Os dados obtidos, utilizando-se o citômetro de fluxo, foram analisados pelo programa FlowJo 7.6.5 software Tree Star. Adotou-se o mesmo critério de análise para as diferentes espécies de *Leishmania*. Primeiramente, criaram-se diferentes regiões (gates) selecionando-se as populações de *Leishmania*, correspondentes a *Leishmania* total (R1), *Leishmania* morta (R2) e *Leishmania* viva (R3) (Figura 7). Realizou-se essa seleção em gráficos de pontos de tamanho por granulosidade (FSC x SSC), tanto para os experimentos de anexina V + PI, bem como para a coloração por CFSE (Figura 7 – A). A partir da seleção do gate, para a análise de anexina V e PI, construiu-se um segundo gráfico de FITC versus PI (FL1 x FL3) (Figura 7 – B). Quadrantes foram posicionados nos para determinação das populações positivas para uma molécula “single positive” (Q1 e Q3), duplo positiva “double positive” (Q2) e duplo negativas “double negative” (Q4). Realizou-se esse posicionamento do quadrante de acordo com as células marcadas apenas com os controles de isotipo. O resultado foi expresso em frequência da taxa de morte, uma vez que o valor expresso nos gráficos de barra corresponde ao somatório dos valores encontrados nos quadrantes Q1, Q2 e Q3. Para a análise da marcação do CFSE, construíram-se histogramas para avaliação da sua expressão (frequência e intensidade média de fluorescência - IMF) para o CFSE (FL1) (Figura 7 – C). Utilizou-se o controle de isotipo para FITC como controle negativo de marcação (Figura 7 - C).

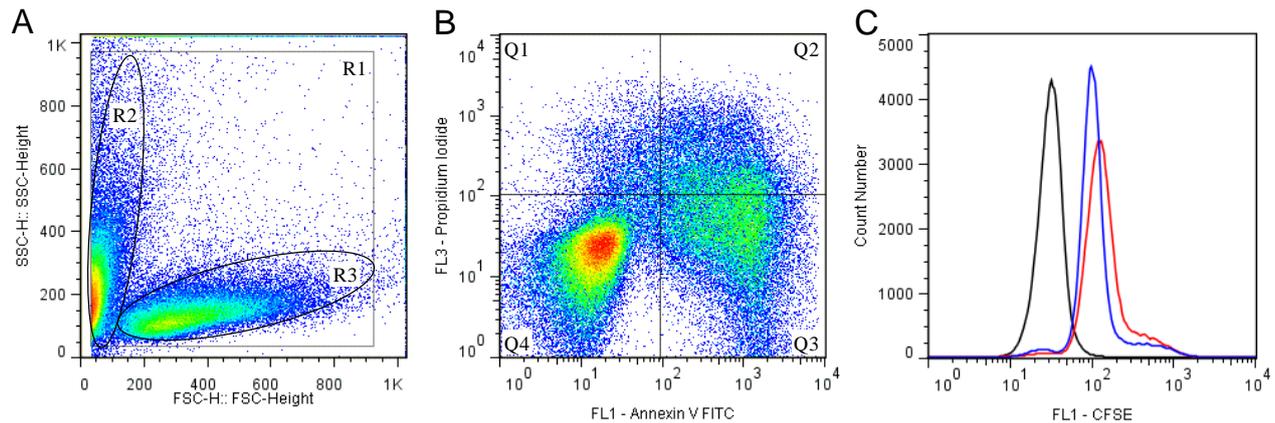


Figura 7: Estratégia de análise utilizada para avaliação da morte celular por expressão de anexina V e iodeto de propídio, e proliferação celular por CFSE nas diferentes espécies de *Leishmania*.

Promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e PI após cultura com anfotericina B, por exemplo, e analisadas utilizando-se citômetro de fluxo. (A) Gráficos de pontos de tamanho versus granulosidade (FSCxSSC) foram construídos, e selecionaram-se diferentes regiões (R1 – total; R2 – mortas e R3 – vivas). Após a seleção da população, realizou-se a avaliação da expressão de anexina V + PI utilizando gráficos de pontos (B). O posicionamento dos quadrantes levou em consideração o controle de isotipo para FITC e FL3. Determinou-se a frequência de morte-apoptose da *Leishmania* pelo somatório dos valores de Q1, Q2 e Q3 (B). Para a análise da proliferação celular por coloração com CFSE, após a seleção da população de *Leishmania* (A), construíram-se histogramas e o valor da IMF foi solicitado para cada tipo de tratamento (C).

4.2.10 – Separação das Formas Promastigotas Metacíclicas por Gradiente de Ficoll 400® para Infecção *in vitro* das CMSP

A separação das formas promastigotas metacíclicas das diferentes espécies de *Leishmania* foi realizado pelo gradiente de Ficoll 400®. Brevemente, no 5º dia de cultura, o conteúdo da garrafa de cultura foi centrifugado a 3300rpm por 15 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet de *Leishmania* formado em PBS, e o conteúdo final foi vertido sob o Ficoll 400® (Sigma Aldrich Chemicals). Este reagente foi diluído em PBS estéril nas concentrações de 20% e 10% e dispostos, nesta ordem, em tubo de plásticos. Em seguida, o gradiente foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, coletou-se o sobrenadante contendo as formas metacíclicas até atingir o primeiro anel formado pelo gradiente de ficoll. Completou-se o volume do tubo contendo o sobrenadante até 30 ml com PBS gelado para lavagem, seguido de centrifugação a 3300rpm por 15 minutos a 4°C. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, e procederam-se os experimentos de infecção, utilizando-se uma taxa de 10 parasitos por célula.

4.2.11 - Infecção *in vitro* das CMSP de Indivíduos Saudáveis por Diferentes Espécies de Leishmania

Para a determinação da infecção *in vitro* dos monócitos presentes nas CMSP por promastigotas metacíclicas de diferentes espécies de *Leishmania*, os parasitos foram corados com CFSE como descrito por Gonçalves e colaboradores (Goncalves, Vieira et al. 2005) e descrito no item 4.2.8 dessa tese. As CMSP foram infectadas *in vitro* em tubos de poliestireno pelas formas promastigotas dos parasitos, coradas ou não por CFSE, na proporção de 10 parasitos:1 célula. Após 4 horas de infecção, as células foram lavadas 3 vezes para retirada do excesso de parasitos, e mantidas em cultura por 24 ou 48 horas na presença das drogas estudadas. Nas análises da taxa de infecção e IMF do CFSE, após cultura de 24 ou 48 horas, as células foram coletadas e levadas para leitura no citômetro de fluxo. Na avaliação da morte celular por expressão de anexina V e PI, após 24 ou 48 horas de cultura, marcaram-se as células como descrito no item 4.2.6 desta tese. Para a avaliação das moléculas co-estimuladoras e citocinas, transcorrido o tempo de cultura, adicionou-se 1 µg/ml de brefeldina A (eBioscience) nos poços, e as células permaneceram por mais 4 horas em cultura. Em seguida, marcaram-se as células com os mAb e estas foram adquiridas em citômetro de fluxo para avaliação dos marcadores de superfície e intracelulares.

4.2.12 – Delineamento Experimental Realizado com os Monócitos Provenientes de CMSP de Indivíduos Saudáveis e Infectados, *in vitro*, com Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos ao Tratamento com Anfotericina B, Glucantime®, DT.15 e NAC

As CMSP de indivíduos saudáveis infectadas *in vitro* com as diferentes espécies de *Leishmania* foram avaliadas após 24 ou 48 horas de tratamento, e em diferentes situações de cultura na parte 2-A dessa tese:

1. CMSP em cultura com meio RPMI completo - grupo **Meio**;
2. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de anfotericina B em duas diferentes concentrações (1 e 3µM) – grupo **Ampho.B**;
3. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de Glucantime® em duas diferentes concentrações (100 e 300µg/ml) – grupo **Glu**;

4. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido da droga teste número 15 em duas diferentes concentrações (3 e 9 μ M) – grupo **DT.15**.

Na parte 2-B, as CMSP de indivíduos saudáveis infectadas *in vitro* com as diferentes espécies de *Leishmania* foram também avaliadas após 24 ou 48 horas de tratamento, e em diferentes situações de cultura:

1. CMSP em cultura com meio RPMI completo - grupo **Meio**;
2. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de 5mM de NAC - grupo **Meio + NAC 5mM**;
3. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de anfotericina B em duas diferentes concentrações (1 e 3 μ M) – grupo **Ampho.B**;
4. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de anfotericina B em duas diferentes concentrações (1 e 3 μ M), e NAC 5mM - grupo **Ampho.B+NAC**;
5. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de Glucantime® em duas diferentes concentrações (100 e 300 μ g/ml) – grupo **Glu**;
6. CMSP em cultura com meio RPMI completo acrescido de Glucantime® em duas diferentes concentrações (100 e 300 μ g/ml), e NAC 5mM - grupo **Glu+NAC**.

*4.2.13 – Avaliação da Morte Celular por Anexina V e Iodeto de Propídio dos Monócitos Infectados *in vitro* ou não por Diferentes Espécies de Leishmania*

Após o tratamento com as drogas leishmanicidas, as células CMSP, infectadas ou não por diferentes espécies de *Leishmania*, foram lavadas duas vezes em PBS gelado. Adicionou-se às amostras o anticorpo anexina V conjugado a FITC diluído em binding buffer. O tempo de incubação foi de 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, lavaram-se as células em binding buffer e, em seguida, ressuspenderam-se as mesmas em 200 μ l da mesma solução. Quando as amostras foram levadas para aquisição no citômetro de fluxo (FACSCantoll – Becton, Dickinson and Company), adicionou-se, no ato da leitura, a solução de iodeto de propídio, segundo recomendação do fabricante (BD Bioscience). O número mínimo de eventos adquiridos foi de 30000 no gate de monócito (região R1 – Figura 8). Todas as leituras foram feitas em baixa velocidade

(Low). Após aquisição, analisou-se a expressão de anexina V (FL1-FITC) e PI (FL3-PE-Cy5.5) na região de monócitos utilizando-se o programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star.

4.2.14 – Estratégia de Análise Utilizada na Citômetria de Fluxo para a Avaliação da Morte Celular por Anexina V e Iodeto de Propídio dos Monócitos, Infectados *in vitro* ou não, por Diferentes Espécies de Leishmania

Os dados obtidos utilizando-se o citômetro de fluxo foram analisados pelo programa FlowJo 7.6.5 software Tree Star. Para a análise dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro*, ou não, por diferentes espécies de *Leishmania*, selecionou-se a região (R1) em gráficos de pontos de tamanho *versus* granulosidade (FSCxSSC) (Figura 8). Uma vez selecionada a população, para a análise de anexina V e PI, construiu-se um segundo gráfico de fluorescência de FITC *versus* PI (FL1 x FL3) (Figura 8). Neste gráfico (FL1xFL3), delimitaram-se quadrantes para determinação das populações single positive (Q1 e Q3), double positive (Q2) e double negative (Q4), tendo como referência para o posicionamento dos quadrantes nas células marcadas com os controles de isotipo. O resultado foi expresso como percentual da frequência da taxa de morte, uma vez que os valores expressos nos gráficos de barras correspondem ao somatório dos valores encontrados nos quadrantes Q1, Q2 e Q3 (Figura 8).

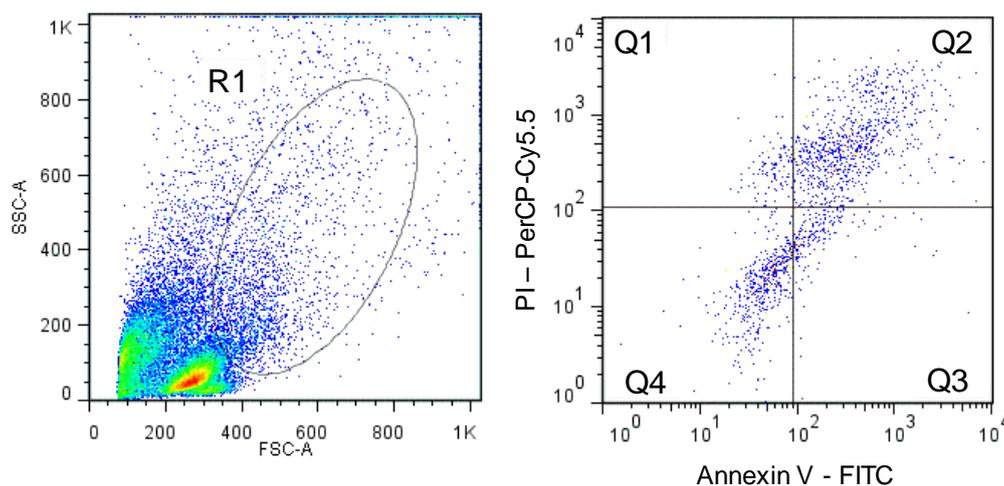


Figura 8: Estratégia de análise utilizada para avaliação da expressão de anexina V e iodeto de propídio em monócitos de CMSP provenientes de indivíduos saudáveis e infectados *in vitro* com diferentes espécies de *Leishmania*.

CMSP infectadas, *in vitro* ou não, por diferentes espécies de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e PI após cultura com drogas e, em seguida, analisadas utilizando-se citômetro de fluxo. Construíram-se gráficos de pontos de tamanho *versus* granulosidade (FSCxSSC) para seleção da população de interesse (R1). Após a seleção, realizou-se a avaliação da expressão de anexina V + PI utilizando-se gráficos de pontos. Determinou-se o percentual da frequência da taxa de morte pelo somatório dos valores de Q1, Q2 e Q3.

4.2.15 – Marcação das Moléculas de Superfície em Monócitos Provenientes de CMSP Infectados *in vitro* por Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos aos Tratamentos com Diversas Drogas

Após a infecção e cultura, as células foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ou Cychrome (Cy) por 20 minutos a 4° C.

As amostras, após marcação, foram lavadas com PBS e fixadas com 200 µL de PBS com 2% de formaldeído (Sigma Aldrich Chemicals) e mantidas a 4° C até a aquisição no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II – Becton, Dickinson and Company). Utilizaram-se para a marcação os mAbs: controles de isotipo, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD11b e anti-HLA-DR, conjugados com FITC (FL-1), PE (FL-2) e Cy (FL-3) provenientes das empresas eBioscience e BD Bioscience.

Para a aquisição, 30000 eventos no gate de monócitos (região R1 – Figura 9), armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular, empregou-se um citômetro de fluxo, equipado com sistema de computador contendo o software BD FACSDiva™ 6.0 software. Analisaram-se os dados obtidos utilizando-se o programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star.

4.2.16 – Marcação Intracelular de Citocinas nos Monócitos de CMSP Infectados *in vitro* por Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos aos Tratamentos com Diversas Drogas

Para avaliar a produção de citocinas intracelular na população de interesse, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ CMSP foram cultivadas, por 24 ou 48 horas, com meio RPMI completo contendo ou não os diferentes tratamentos (Ampho.B, Glucantime®, DT.15 e NAC). Durante as últimas 4 horas de cultura das CMSP, adicionou-se 1 µg/ml de brefeldina A (eBioscience) nos poços. Após centrifugação (1200 rpm, 10 minutos a 4°C), as células foram marcadas com mAb anti-moléculas de superfície (como descrito no item 4.2.15) e fixadas em solução de PBS contendo 2% de formaldeído. Após fixação, permeabilizaram-se as células com solução de saponina (0,5% em PBS) (Sigma Aldrich Chemicals), e incubando-as com mAb conjugados com PE (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF) (eBioscience) por 30 minutos a 4° C. As células foram lavadas duas vezes, fixadas e

adquiridas utilizando-se o citômetro de fluxo (BD FACSCanto II – Becton, Dickinson and Company).

Para a aquisição, 30000 eventos no gate de monócitos (região R1 – Figura 9), armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular, empregou-se um citômetro de fluxo, equipado com sistema de computador contendo o software BD FACSDiva™ 6.0 software.

*4.2.17 – Estratégia de Análise dos Monócitos de CMSP Infectados *in vitro* por Diferentes Espécies de Leishmania e Submetidos aos Tratamentos com as Drogas*

Após aquisição das amostras, analisaram-se os dados obtidos utilizando-se o programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star.

As avaliações do perfil celular da amostra foram realizadas, com relação ao tamanho e a granulosidade das CMSP infectadas *in vitro*, ou não, pelas diferentes espécies de *Leishmania*, selecionando-se a região R1 dos monócitos (Figura 9 - A). Confirmou-se a identificação da população celular de interesse por gráficos de intensidades de fluorescências CD14⁺ e CD16⁺ para os monócitos provenientes de CMSP infectadas *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania*. Após identificação, selecionaram-se as subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ (Figura 9 – B), e contruíram-se histogramas para quantificação do segundo marcador (Região M1). Esse segundo marcador poderia ser moléculas de ativação presente na superfície dos monócitos (CD11b, CD80, CD86 e HLA-DR), bem como citocinas intracelulares (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF) (Figura 9).

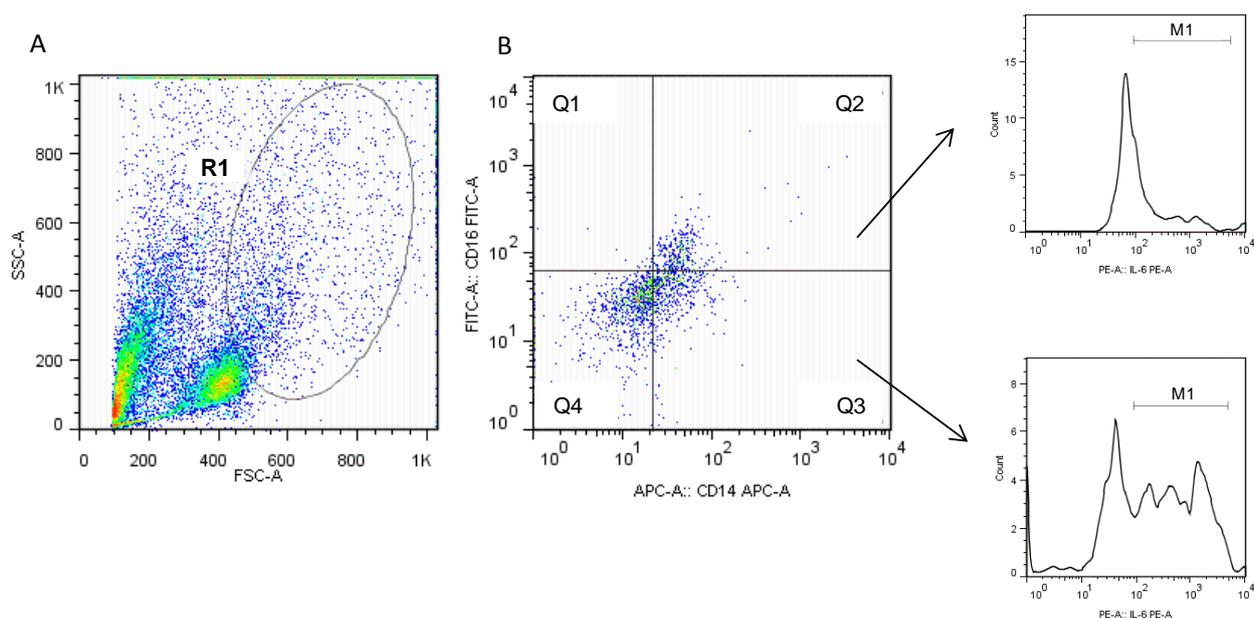


Figura 9: Estratégia de análise utilizada para avaliação da expressão de marcadores de superfície e intracelulares em monócitos infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania*.

Monócitos infectados *in vitro* provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis foram marcados com anticorpos de superfície e citocinas após cultura com drogas de ação leishmanicida, e analisados utilizando-se citômetro de fluxo. Construíram-se gráficos de pontos de tamanho *versus* granulosidade (FSCxSSC), e selecionou-se a população de monócito (região R1) (A). Após a seleção, realizou-se a avaliação da expressão dos marcadores constitutivos CD14⁺ e CD16⁺ utilizando-se gráficos de fluorescência (B). Para avaliação dos marcadores de ativação e citocinas, construiu-se histograma, e o valor da frequência e IMF foi solicitado para cada subpopulação de monócito.

4.2.18 - Análises Estatísticas

Realizaram-se as análises estatísticas com o auxílio do software JMP 5.0.1® e GraphPad Prism 5.0.® (San Diego, EUA). Todos os resultados desse estudo foram submetidos aos testes de outliers e normalidade (teste de Shapiro-Wilk). Para análise de variáveis não categóricas (variáveis não paramétricas), realizou-se o teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

5.0 – RESULTADOS

5.1 – Parte 1- Avaliação Imunofenotípica de Monócitos CD14⁺ Presentes no Sangue Periférico de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

5.1.1 – Expressões de Moléculas Co-Estimuladoras em Monócitos CD14⁺ de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

O sangue de indivíduos não infectados (NI) e de pacientes infectados por *L. braziliensis* foi coletado como descrito e avaliado com relação à expressão de moléculas co-estimuladoras. Observou-se que os pacientes com leishmaniose cutânea (LC) apresentavam uma menor expressão para os marcadores CD80 e CD86 em relação aos indivíduos não infectados (Figura 10-A e B).

Não houve diferenças entre pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos não infectados para a expressão dos marcadores CD40, CD11b e HLA-DR (dados não mostrados).

O CD16, também denominado FcγRIII, reconhece as subclasses de IgG1 e IgG3, ativando a ação citotóxica, principalmente por células NK, levando a morte das células alvo. Com relação à frequência da expressão de CD16 em monócitos CD14⁺, pode-se observar uma elevada expressão desse marcador nos pacientes com leishmaniose cutânea quando comparados com os indivíduos não infectados (Figura 10-C).

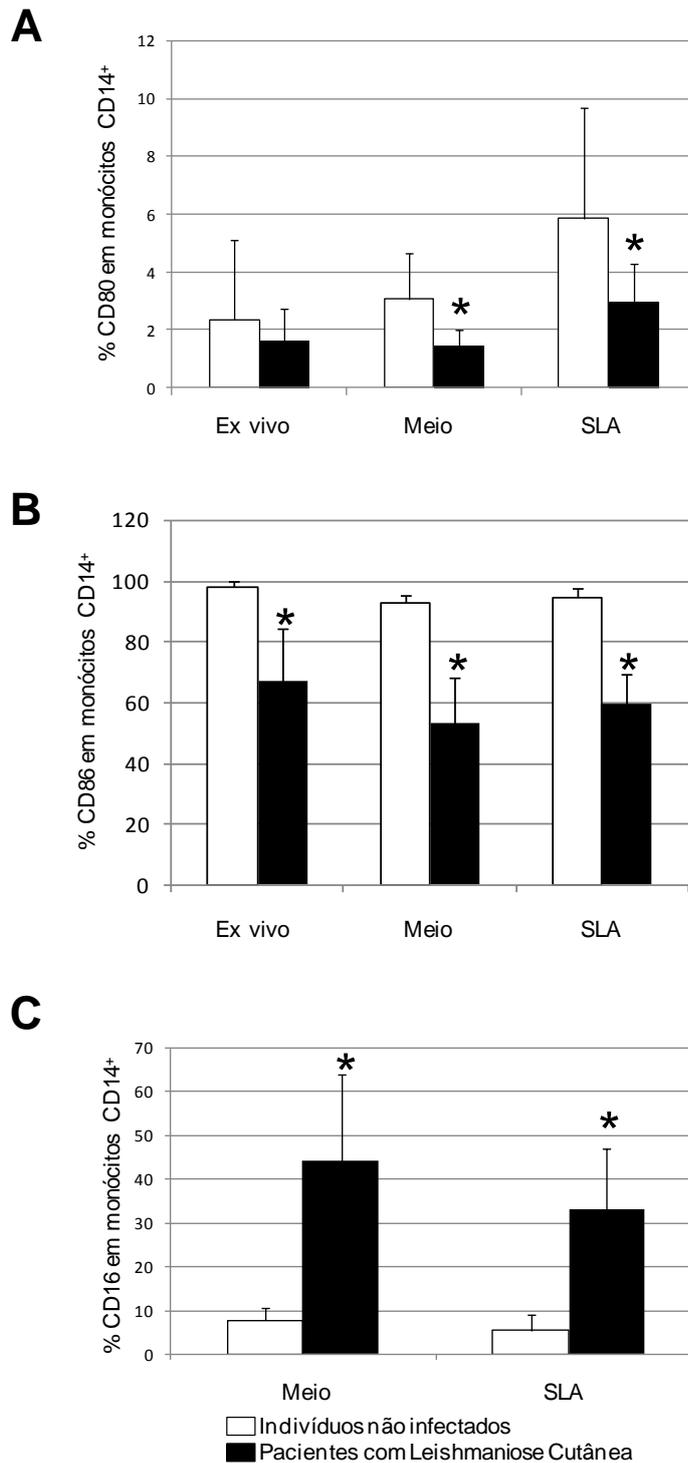


Figura 10: Expressão de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e da molécula CD16 em monócitos CD14⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos não-infectados, isolados de *ex vivo*, ou após cultura *in vitro* com meio ou SLA.

CMSP de pacientes com LC e de indivíduos não infectados foram mantidas em cultura na presença ou ausência do estímulo SLA, ou avaliadas a fresco (condição *ex vivo*). Após 20 horas as células foram marcadas para avaliação da expressão dos marcadores CD14, CD16, CD80 e CD86. Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e B) representam a expressão de CD80 e CD86, respectivamente, nas condições *ex vivo*, Meio e SLA. (C) representa a expressão de CD16 nas condições de Meio e SLA. Os indivíduos não infectados - NI são representados pelas barras brancas, e pacientes com LC pelas barras pretas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com número amostral de 6 indivíduos para o grupo NI e 10 pacientes para o grupo LC. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos. * $p < 0,05$.

5.1.2 – Expressões Intracelular de Citocinas em Monócitos CD14⁺ de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo, já demonstraram a importância das citocinas na patogênese e curso da leishmaniose cutânea (Bottrel, Dutra et al. 2001; de Carvalho, Soto et al. 2003; Antonelli, Dutra et al. 2004; Antonelli, Dutra et al. 2005; Faria, Gollob et al. 2005; Faria, Souza et al. 2009). Também, neste trabalho, avaliou-se a expressão de citocinas intracelulares em monócitos de pacientes com LC e, como descrito na literatura, observou-se uma alta produção de TNF por essas células quando colocadas em cultura com o antígeno solúvel de *Leishmania* em relação à cultura com meio (Figura 11-A). Pode-se observar que, como esperado, houve uma alta produção de TNF em cultura, principalmente quando estimulados por SLA, pelos pacientes LC quando comparados a indivíduos NI (Figura 11-B).

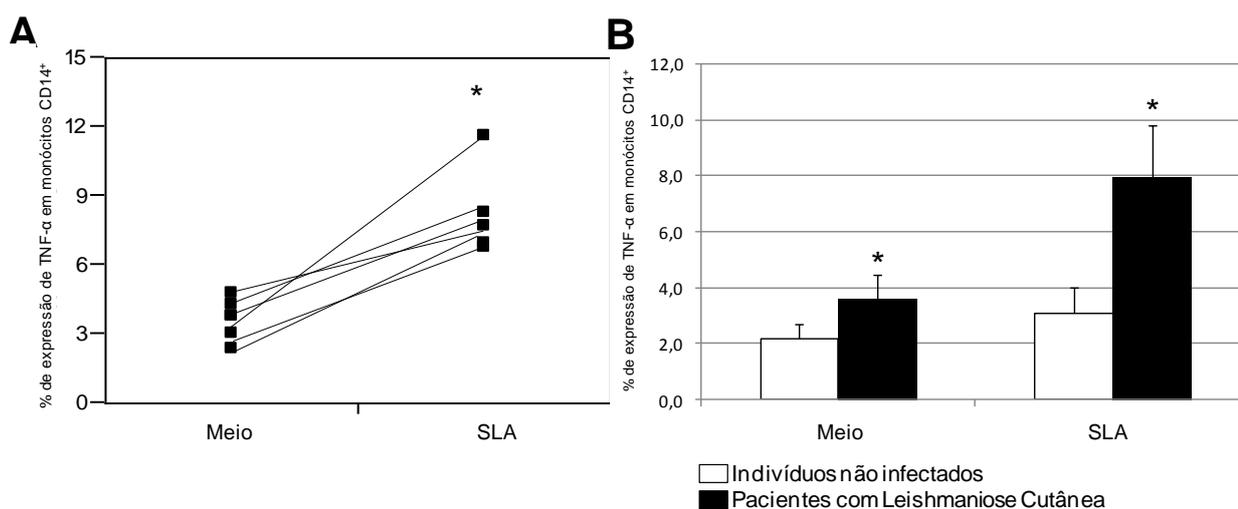


Figura 11: Pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram alta frequência TNF em monócitos CD14⁺, principalmente após estímulo com SLA.

CMSP de pacientes com LC e de indivíduos não infectados (NI) foram mantidas em cultura na presença ou ausência do estímulo SLA. Após 20 horas, as células foram marcadas para avaliação dos marcadores CD14 e TNF. Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A) representa a expressão de TNF nos pacientes LC, apresentados em gráfico de dispersão individual, estimulados ou não com SLA. (B) representa a expressão de TNF nos indivíduos NI (barra branca) e pacientes com LC (barra preta), estimulados ou não com SLA. Resultados expressos em média e desvio padrão, com número amostral de 6 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições (A) e entre os diferentes grupos (B). * = $p < 0,05$.

Com relação à expressão da citocina IL-10 pelos monócitos CD14⁺, não se encontraram diferenças entre as diferentes condições dentro do mesmo grupo. Quando se compara os diferentes grupos (paciente LC e indivíduos NI), houve tendência a um aumento na expressão de IL-10 por essas células quando em cultura com SLA ($p=0,054$), no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 12).

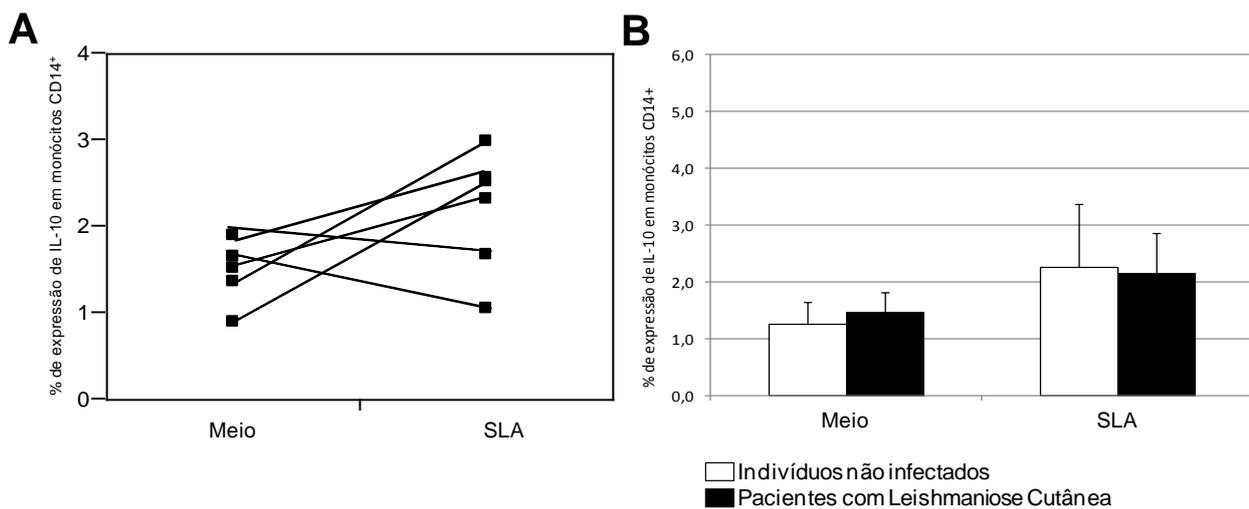


Figura 12: Expressão de IL-10 por monócitos CD14⁺ de pacientes infectados por *L. braziliensis* não apresenta alterações entre os grupos e as diferentes condições de cultura. CMSP de pacientes com LC e de indivíduos não infectados (NI) foram mantidas em cultura na presença ou ausência do estímulo SLA. Após 20 horas, as células foram marcadas para avaliação dos marcadores CD14 e IL-10. Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A) representa a expressão de IL-10 nos pacientes com LC, apresentados em gráfico de dispersão individual, estimulados ou não com SLA. (B) representa a expressão de IL-10 nos indivíduos NI (barra branca) e pacientes com LC (barra preta), estimulados ou não com SLA. Resultados estão expressos em média e desvio padrão, com número amostral de 6 indivíduos para cada grupo.

Também não houve diferença na produção de IL-12 pelos monócitos CD14⁺ do sangue periférico quando se avaliou apenas os pacientes com LC (Figura 13-A).

A produção de IL-12 nos pacientes com LC foi significativamente menor quando comparada com a dos indivíduos NI (Figura 13-B).

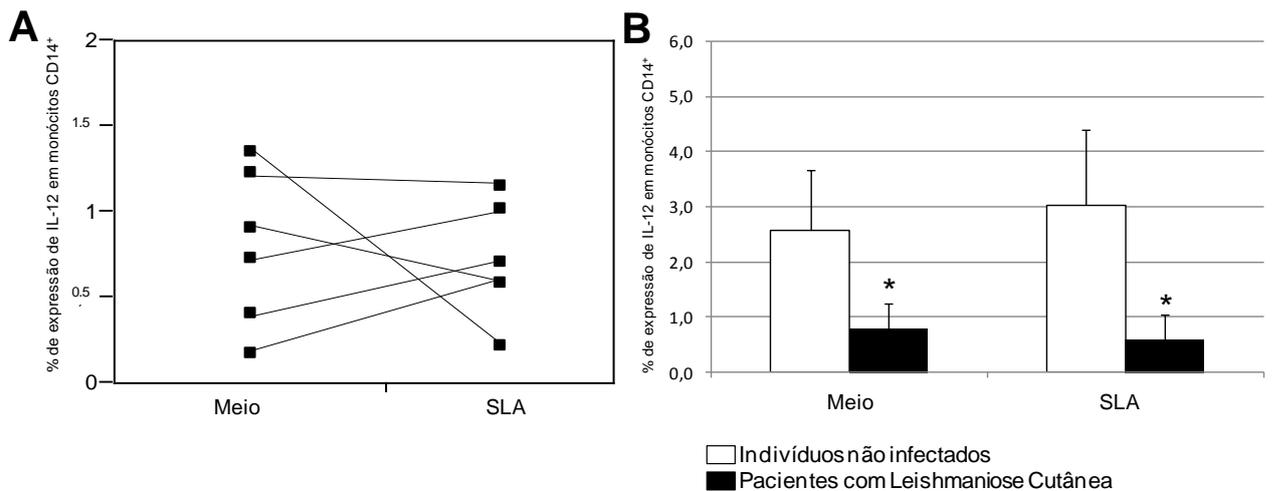


Figura 13: Monócitos CD14⁺ de pacientes infectados por *L. braziliensis* produzem menos IL-12 em relação aos dos indivíduos não infectados.

CMSP de pacientes com LC e de indivíduos não infectados (NI) foram mantidas em cultura na presença ou ausência do estímulo SLA. Após 20 horas, as células foram marcadas para avaliação dos marcadores CD14 e IL-12. Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A) representa a expressão de IL-12 nos pacientes LC, apresentados em gráfico de dispersão individual, estimulados ou não com SLA. (B) representa a expressão de IL-12 nos indivíduos NI (barra branca) e pacientes com LC (barra preta), estimulados ou não com SLA. Resultados estão expressos em média e desvio padrão, com número amostral de 6 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições (A) e entre os diferentes grupos (B). *= $p < 0,05$.

5.1.3 – Correlações entre a Produção de Citocinas e Moléculas Co-estimuladores de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

Buscando determinar se houve relação entre as variáveis estudadas bem como com as informações clínicas destes pacientes (Tabela 1), realizaram-se análises de correlações. Como se pode observar na figura 11, as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 correlacionaram-se positivamente tanto na condição *ex vivo*, como na condição de cultura com SLA (Figura 14).

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea – P1 a P10

Identificação do Paciente	Sexo	Idade	Área da Lesão Total (mm ²)£	Reação	
				Intradermica de Montenegro - MST (mm ²) §	Tempo de Lesão - Dias
P1	Masculino	50	690	168	20
P2	Feminino	37	192	324	30
P3	Masculino	27	180	90	60
P4	Feminino	36	224	182	14
P5	Masculino	41	56	224	15
P6	Feminino	23	180	169	15
P7	Masculino	24	154	196	30
P8	Feminino	22	228	63	30
P9	Masculino	54	90	63	30
P10	Masculino	25	168	342	30

£ Área de dois diâmetros por cada lesão ou MST. §Tempo de lesão relatado pelo paciente; N.D. Não Detectado.

Não houve correlação entre a expressão de moléculas co-estimuladoras e os dados clínicos desses pacientes.

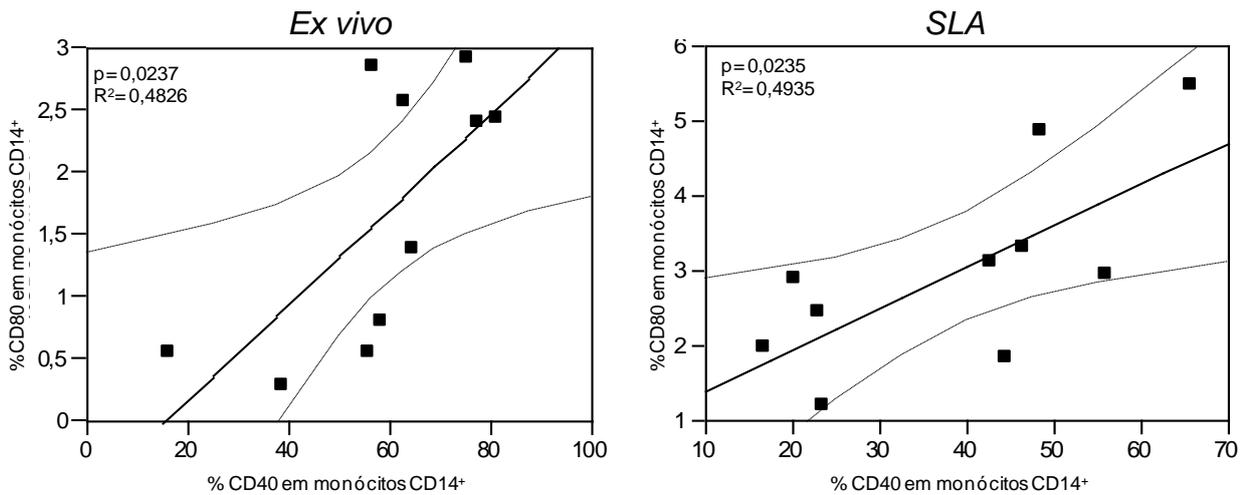


Figura 14: Correlação positiva entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 em monócitos CD14⁺ de pacientes infectados por *L. braziliensis*, nas condições *ex vivo* e SLA. Resultados expressos em diagramas de dispersão, com número amostral de 10 indivíduos.

Foram também avaliadas as correlações entre a produção de citocinas com a expressão de moléculas co-estimuladoras. No entanto, observaram-se apenas correlações positivas entre a produção da citocina IL-12 com a expressão das moléculas CD80 e CD40 na condição de cultura com a presença do antígeno SLA (Figura 15).

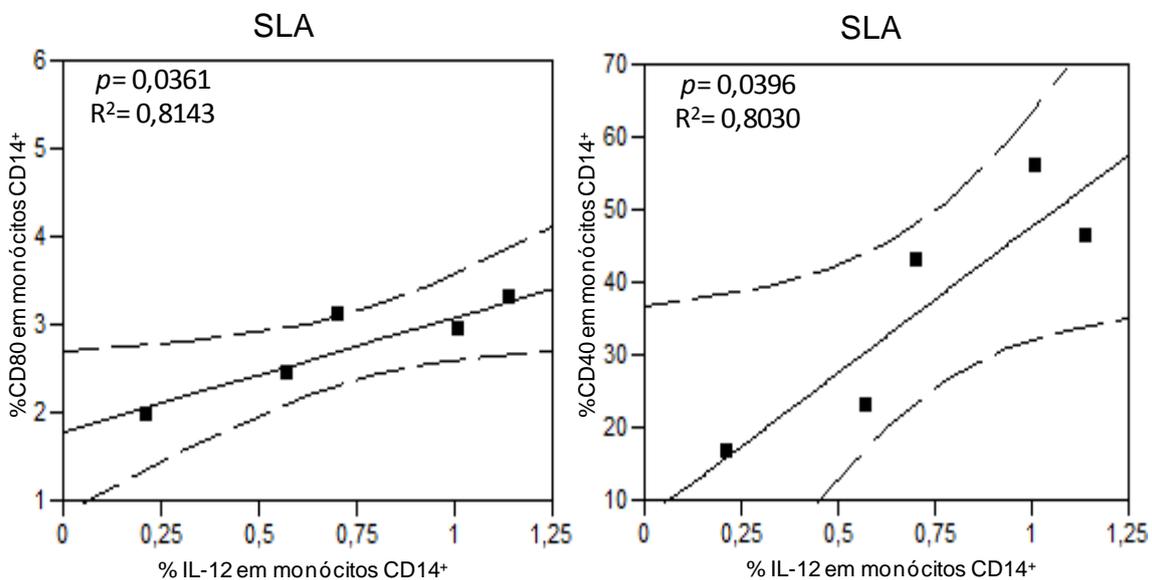


Figura 15: Moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 correlacionam-se positivamente com a produção de IL-12 em monócitos CD14⁺ de pacientes infectados por *L. braziliensis*, na condição SLA. Resultados expressos em diagramas de dispersão, com número amostral de 5 indivíduos.

A expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 apresentou correlação positiva com a produção da citocina IL-12.

De forma interessante, quando se realizaram as análises de correlação entre a expressão da molécula co-estimuladora CD86 e de CD80 e CD40, observaram-se correlações negativas entre as mesmas (Figura 16) na condição *ex vivo*.

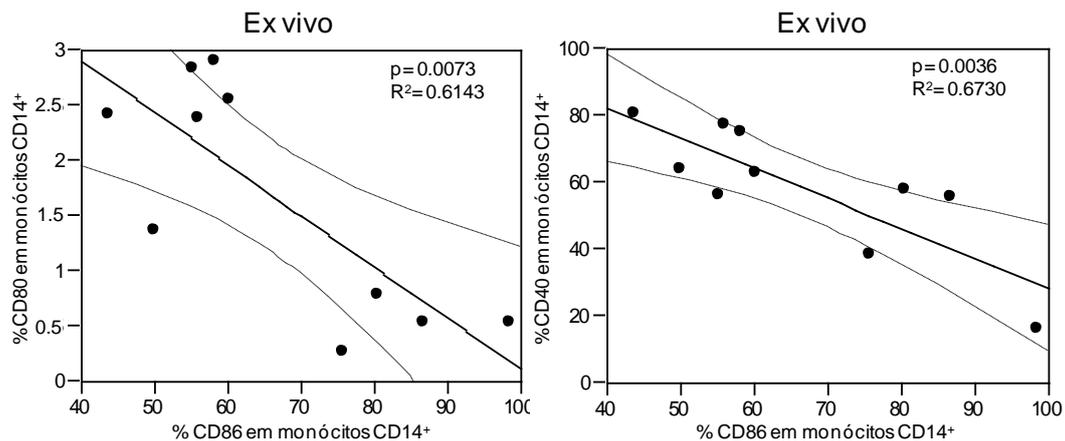


Figura 16: Moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40 correlacionam-se negativamente com a expressão de CD86 em monócitos CD14⁺ de pacientes infectados por *L. braziliensis* na condição *ex vivo*. Resultados expressos em diagramas de dispersão, com número amostral de 10 indivíduos.

Não foram encontradas correlações entre essas mesmas moléculas em outras condições ou com outros marcadores.

5.1.4 – Expressão do Receptor do Tipo Toll 9 (TLR9) em Monócitos CD14⁺ de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

Abou Fakher e colaboradores (2009) demonstraram que o DNA de *L. major* foi capaz de induzir a ativação de TLR9 em células dendríticas, levando a uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4. Sabe-se que os linfócitos produtores de IFN- γ possuem um papel crucial no curso da leishmaniose, induzindo aumento da atividade leishmanicida pelo macrófago e cura da doença (Abou Fakher, Rachinel et al. 2009).

Estudos científicos demonstraram um importante papel do receptor TLR9 em processos de infecções por protozoários, como *Plasmodium falciparum*, um dos agentes etiológicos da malária (Franklin, Parroche et al. 2009). Como é pouco conhecido o papel

deste TLR na leishmaniose cutânea, avaliou-se a expressão em monócitos presentes no sangue periférico dos pacientes com essa doença.

Avaliando-se apenas a expressão de TLR9 nos pacientes com LC, observou-se que houve aumento na expressão de TLR9 quando os monócitos foram submetidos à cultura e na presença de SLA (Figura 17-A). A avaliação realizada em gráficos de dispersão individual indica um aumento de cerca de 2 a 3 vezes quando se comparam as células estimuladas com SLA em relação as incubadas apenas com meio (Figura 17-A).

Quando se comparou a expressão do receptor TLR9 entre os grupos NI e LC, de forma bastante interessante, as culturas de células provenientes dos pacientes apresentaram aumento na frequência de TLR9 em comparação às de indivíduos NI após estímulo com SLA (Figura 17-B). Esse resultado sugeriu uma possível ação desse receptor na leishmaniose cutânea, uma vez que a alteração ocorreu de forma específica à presença do antígeno SLA.

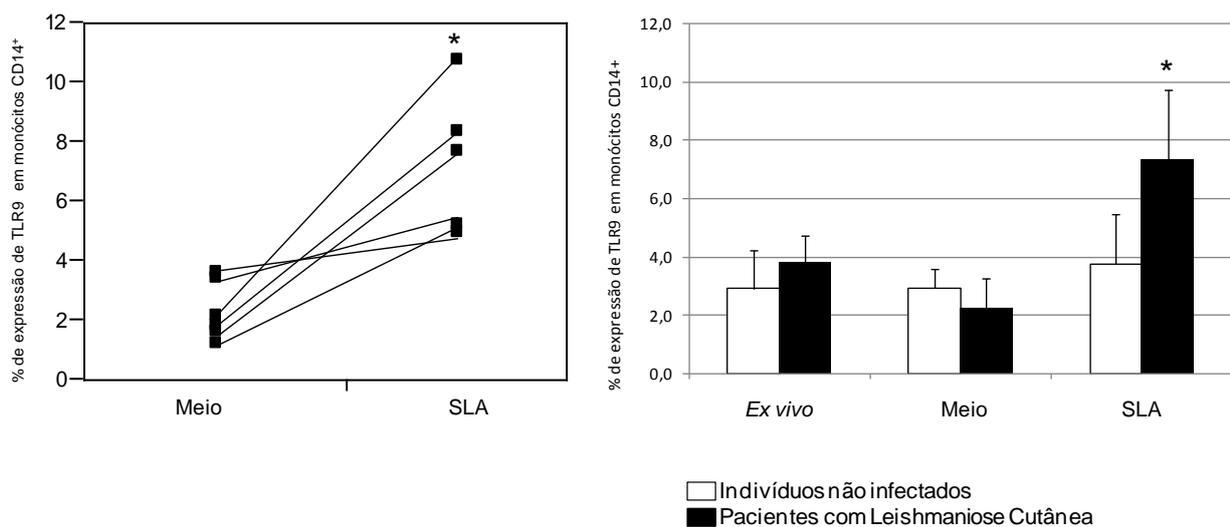


Figura 17: Monócitos CD14⁺ de pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentam alta expressão de TLR9 após estímulo com SLA.

CMSP de pacientes com LC e de indivíduos não infectados (NI) foram mantidas em cultura na presença ou ausência do estímulo SLA. Após 20 horas, as células foram marcadas para avaliação dos marcadores CD14 e TLR9. Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A) representa a expressão de TLR9 nos pacientes LC, apresentados em gráfico de dispersão individual, estimulados ou não com SLA. (B) representa a expressão de TLR9 nos indivíduos NI (barra branca) e pacientes com LC (barra preta), estimulados ou não com SLA. Resultados expressos em média e desvio padrão, com número amostral de 6 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições (A) e entre os diferentes grupos (B). *= $p < 0,05$.

5.1.5 – Correlação entre a Área da Lesão e a Expressão de TLR9 em Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

Diante desse contexto, investigou-se se havia alguma correlação na expressão de TLR9 com outro marcador ou parâmetro clínico. Para isso, coletaram-se os dados clínicos dos indivíduos avaliados para a expressão de TLR9 em monócitos (Tabela 2).

Tabela 2: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea – P11 a P16

Identificação do Paciente	Sexo	Idade	Área da Lesão Total (mm ²)	Reação Intradérmica de Montenegro - MST (mm ²) £	Tempo de Lesão - Dias §
P11	Feminino	20	25	462	90
P12	Masculino	23	70	90	38
P13	Masculino	33	168	80	15
P14	Masculino	21	576	ND	30
P15	Masculino	41	300	ND	40
P16	Masculino	21	876	36	20

£ Área de dois diâmetros por cada lesão ou MST. §Tempo de lesão relatado pelo paciente; N.D. Não Detectado.

De forma bastante interessante, encontrou-se correlação positiva entre a área total da lesão e a expressão de TLR9 (Figura 18).

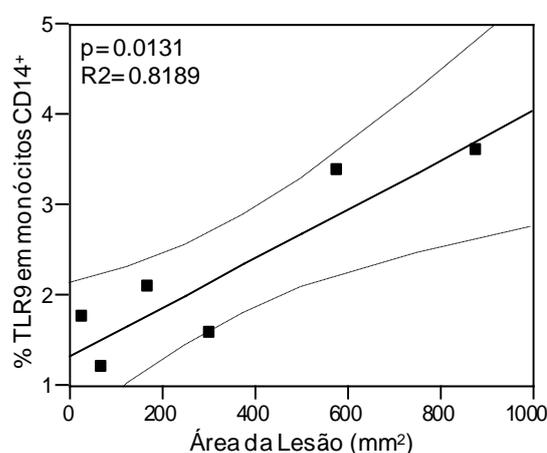


Figura 18: Receptor TLR9 correlaciona-se positivamente com a área total da lesão em pacientes infectados por *L. braziliensis*, na condição meio. Os resultados expressos em diagramas de dispersão, com número amostral de 6 indivíduos.

Esses resultados sugerem que os monócitos, células da imunidade inata, desempenham papel relevante na leishmaniose cutânea. A partir dessas informações, questionou-se como seria o comportamento dessas mesmas células no tratamento com drogas de ação leishmanicida.

5.2 - Parte 2- Efeito Leishmanicida de Diferentes Drogas em Culturas de *Leishmania* e em CMSP Infectadas *in vitro* por Diferentes Espécies de *Leishmania*

5.2.1 – Parte 2-A - Avaliação do Efeito Leishmanicida das Drogas Anfotericina B, Glucantime® e DT.15

5.2.1.1 – Avaliação do Efeito Leishmanicida das Drogas Anfotericina B e DT.15 em Culturas de *L. braziliensis* e *L. major*

Um dos principais objetivos na segunda parte dessa tese foi avaliar o efeito leishmanicida de novas drogas comparadas ao tratamento padrão. Inicialmente, realizou-se o tratamento nas culturas de *Leishmania* com anfotericina B e a droga teste nº15, denominadas nas figuras desse trabalho como Ampho e DT.15, respectivamente. Para esses experimentos utilizaram-se duas espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis* e *L. major*. A figura 19 ilustra o desenho experimental utilizado nessa primeira parte dos experimentos.

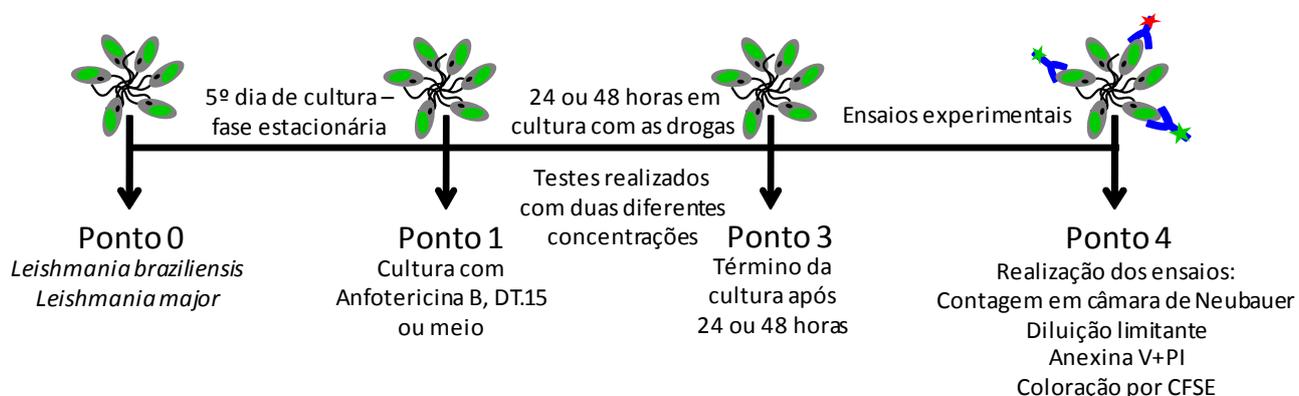


Figura 19: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos leishmanicidas das drogas anfotericina B e DT.15 em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*.

Os primeiros experimentos realizados para avaliar o efeito leishmanicida foram a contagem em câmara de Neubauer e o ensaio de diluição limitante. Como se pode observar na figura 20, o número de *Leishmania* encontrado pela contagem dos parasitos em câmara de Neubauer após os tratamentos com anfotericina B e DT.15 foi significativamente menor quando comparado ao controle para as duas espécies de *Leishmania* (Figura 20). Observou-se essa diferença nas duas concentrações das drogas, e nos dois tempos de cultura (Figura 20).

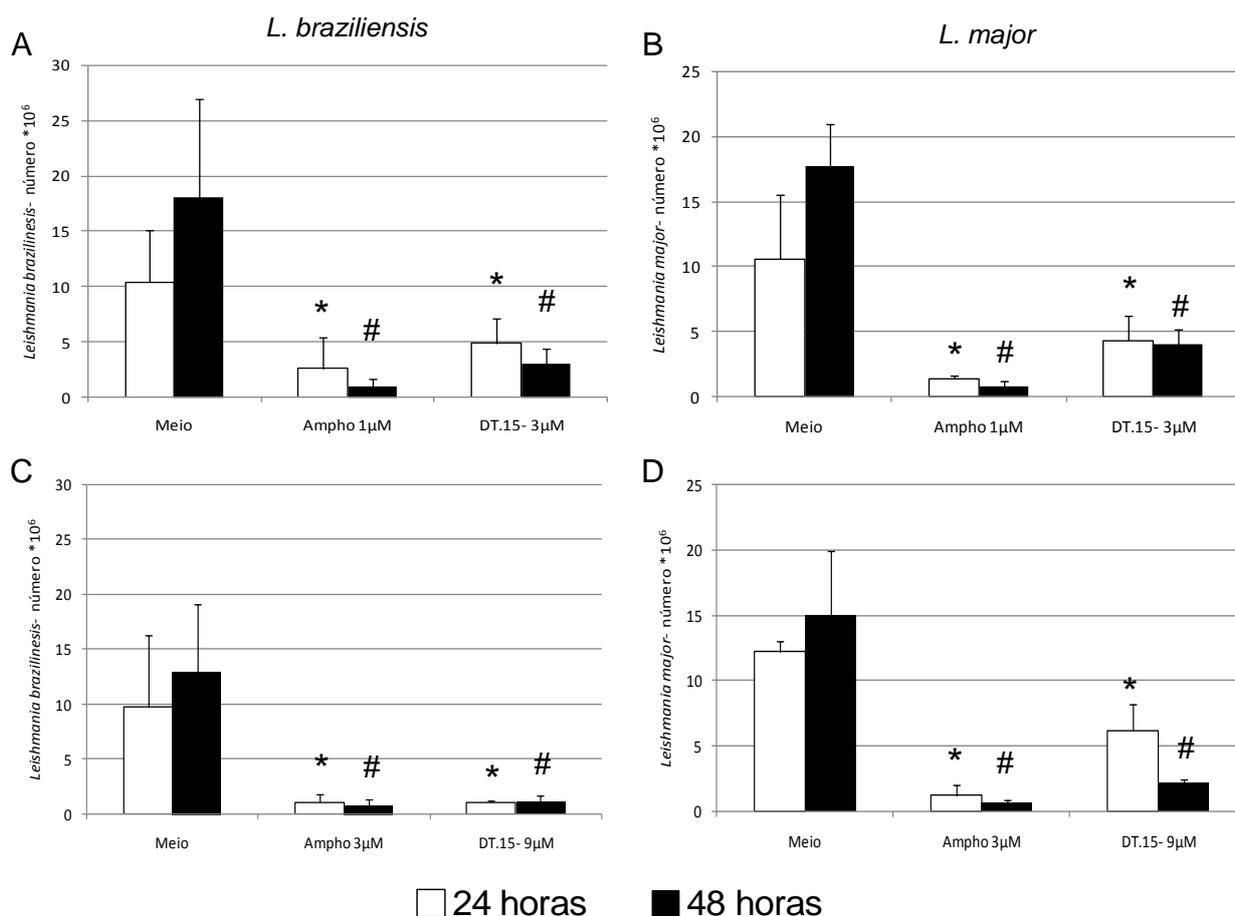


Figura 20: Drogas anfotericina B e DT.15 apresentam atividade leishmanicida em cultura de *L. braziliensis* e *L. major* por contagem dos parasitos em câmara de Neubauer.

As espécies de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura na presença ou ausência das drogas anfotericina B (Ampho) e droga teste nº.15 (DT.15) em duas diferentes concentrações (1 e 3µM; e 3 e 9µM, respectivamente). Após 24 ou 48 horas, as células foram fixadas em solução de PBS/formaldeído 4% e contadas em câmara de Neubauer. (A e C) representam o número de *L. braziliensis* obtido utilizando duas diferentes concentrações de Ampho e DT.15. (B e D) representam o número de *L. major* obtido utilizando duas diferentes concentrações de Ampho e DT.15. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativos de 3 experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Resultado semelhante foi encontrado para a avaliação da atividade leishmanicida por diluição limitante. Observou-se, na figura 21, que o número de *Leishmania* encontrado no experimento de diluição limitante após os tratamentos com anfotericina B e DT.15 foi significativamente menor quando comparado ao controle, tanto para as duas espécies de *Leishmania*, quanto para as duas concentrações de droga utilizada em ambos os tempos de cultura (Figura 21).

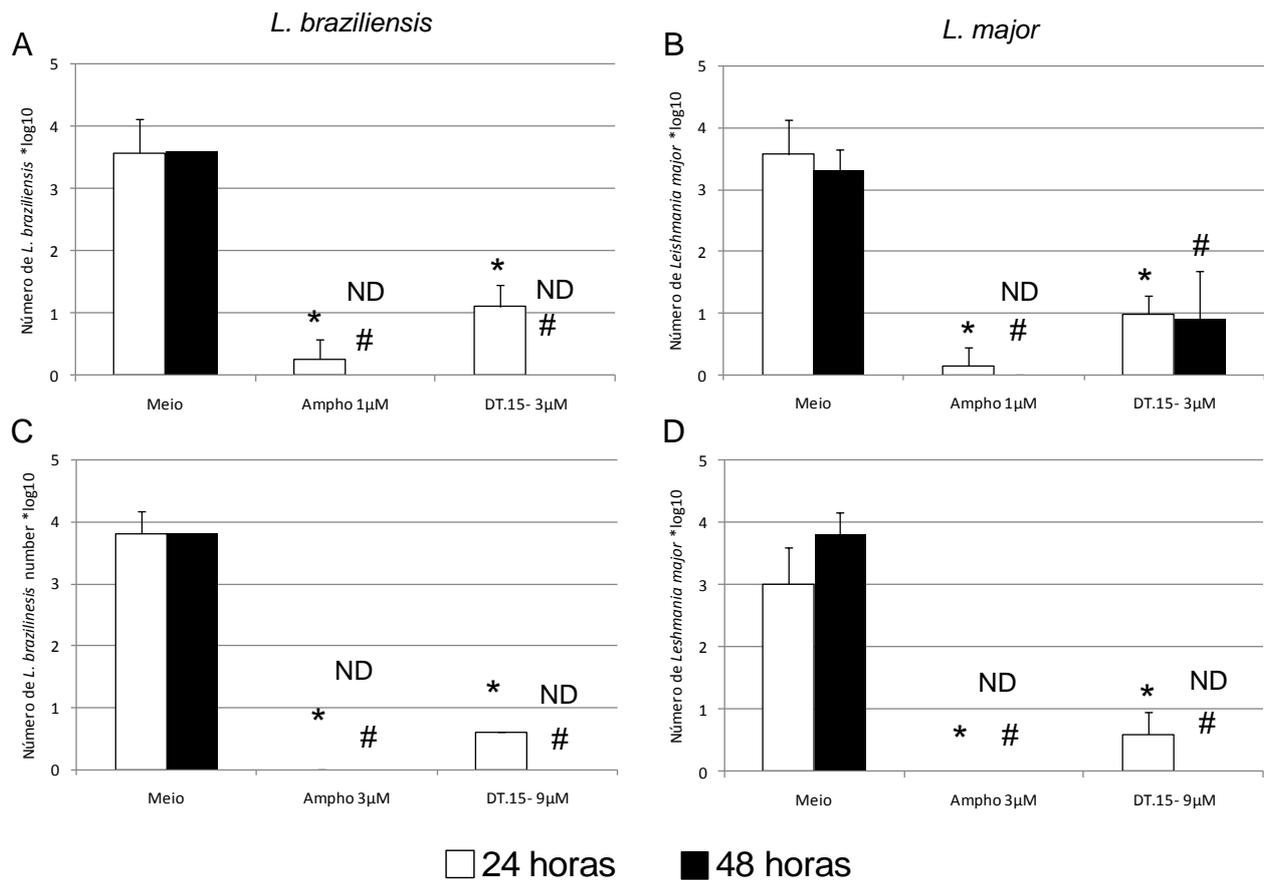


Figura 21: Drogas anfotericina B e DT.15 apresentam atividade leishmanicida em cultura de *L. braziliensis* e *L. major* por diluição limitante.

As espécies de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura na presença ou ausência das drogas anfotericina B (Ampho) e droga teste n.º.15 (DT.15) em duas diferentes concentrações (1 e 3µM; e 3 e 9µM, respectivamente). Após 24 ou 48 horas, as células foram lavadas e colocadas em cultura em meio Schneider completo por mais 5 dias. Após esse período, foi feita a avaliação do crescimento celular em microscópio invertido. (A e C) representam o número de *L. braziliensis* obtido utilizando duas diferentes concentrações de Ampho e DT.15. (B e D) representam o número de *L. major* obtido utilizando duas diferentes concentrações de Ampho e DT.15. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativo de 3 experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas. Utilizou-se ND para os valores não detectáveis.

Diante desses resultados, observou-se que houve um efeito leishmanicida da droga teste DT.15 de forma semelhante a droga padrão anfotericina B. A partir desses resultados questionou-se se a droga padrão realmente leva a morte do parasito ou se inibe a sua proliferação. Para responder a esses questionamentos, realizou-se o experimento com anexina V e iodeto de propídio para determinação da morte celular, seja por apoptose, necrose ou ambos.

Para ilustrar o perfil celular e a expressão de anexina V e PI, figuras contendo gráficos de pontos (dot-plot) de tamanho *versus* granulosidade (FSCxSSC), e fluorescência 1 *versus* fluorescência 3 (FL1xFL3) foram construídos utilizando-se apenas uma espécie de *Leishmania* (*L. major*), em uma única concentração e nos dois diferentes tempos de cultura (Figuras 22 e 23). Cabe ressaltar que perfil semelhante foi observado para a espécie de *L. braziliensis* (dados não mostrados).

De forma bastante interessante, pode-se observar, na figura 22, que houve uma mudança no perfil morfológico da *Leishmania* na presença das drogas, seja por anfotericina B ou DT.15. As células mudaram o perfil, localizando-se mais a esquerda do gráfico FSCxSSC, indicando assim, maior morte celular. No entanto, quando se avaliou separadamente cada população, pode-se observar que, após o tratamento com a droga DT.15, mesmo apresentando uma baixa frequência de células viáveis (vivas), na região contendo células mortas e todas as células (total), o tratamento levou a uma baixa expressão de anexina V e PI quando comparado a droga anfotericina B (Figura 22).

Resultado semelhante foi encontrado nas culturas após 48 horas de tratamento (Figura 23). No entanto, notou-se nesta figura que houve expansão celular, com aumento no número de promastigas de *Leishmania* viáveis (gráficos FSCxSSC), após 48 horas de cultura e em todos os tratamentos (Figura 23). O tratamento com DT.15 também foi mais eficiente nesse tempo de cultura, uma vez que houve aumento na expressão de anexina V e PI após este tratamento (Figura 23).

Ambos os resultados apresentados reforçam os indícios de que houve uma alteração da *Leishmania* após o tratamento com DT.15, não sendo esta apenas devido a morte celular.

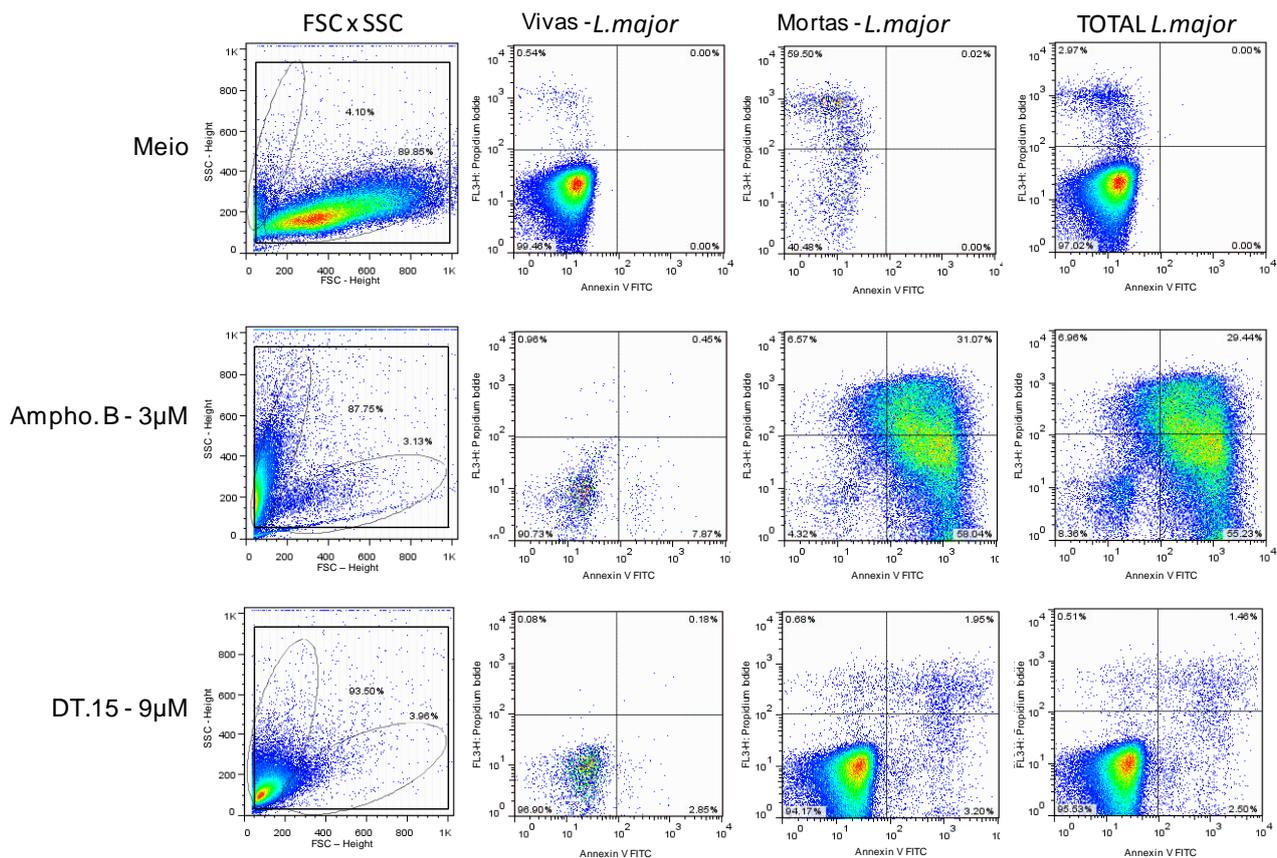


Figura 22: Tratamento com DT.15 não induziu a morte celular e apoptose como o tratamento com a droga padrão anfotericina B após 24 horas de culturas em *L. major*.

Após 24 horas de cultura com Ampho B (3µM), ou DT.15 (9µM) ou meio (controle negativo), promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de FSCxSSC foram construídos para seleção das diferentes populações de *L. major* (vivas, mortas e total). Após a seleção, a expressão de anexina V e PI foi determinada pelo posicionamento dos quadrantes em gráficos de pontos de fluorescência 1 (FL1- FITC) versus fluorescência 3 (FL3 – PercP-Cy5.5).

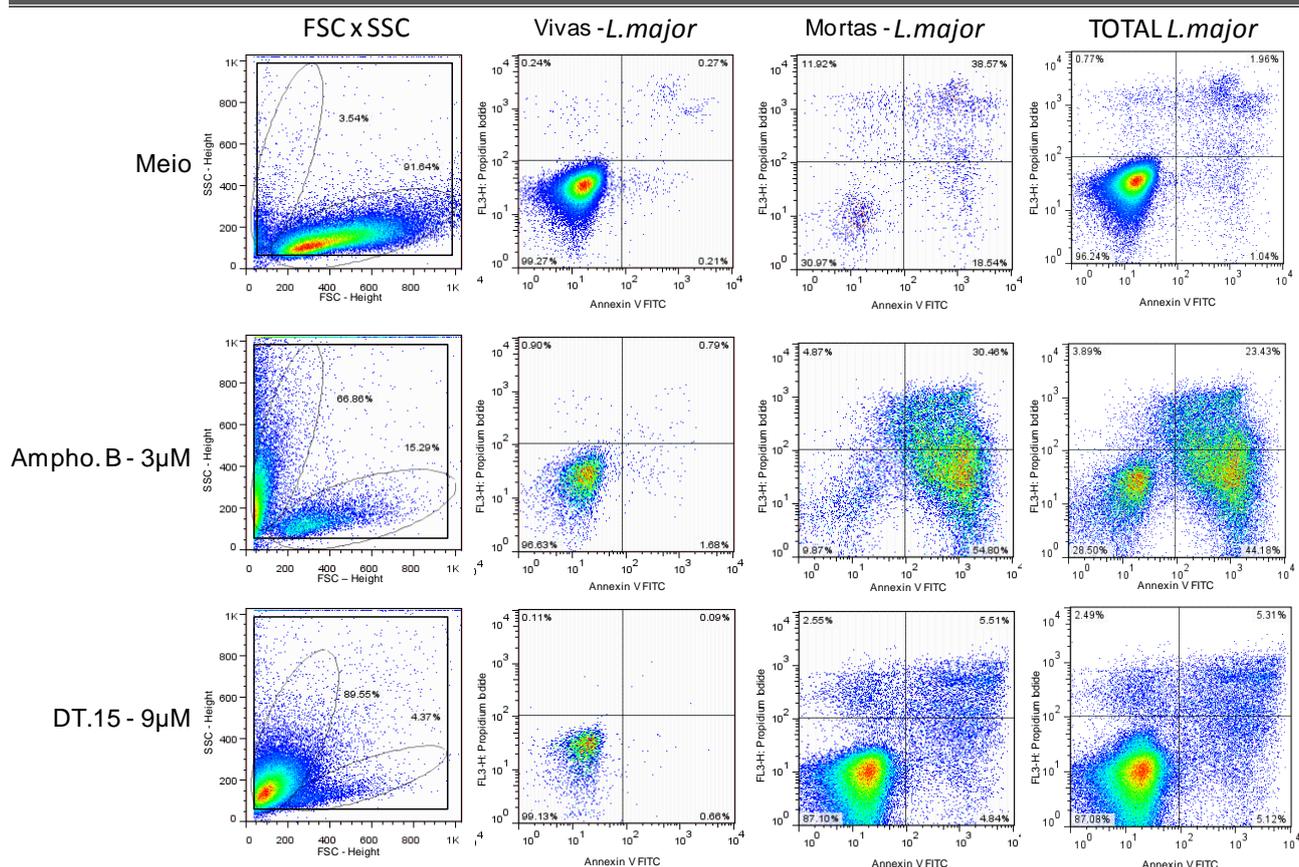


Figura 23: Droga DT.15 aumenta morte celular e apoptose após 48 horas, mas não como a droga de tratamento padrão anfotericina B em culturas de *L. major*.

Após 48 horas de cultura com Ampho B (3µM), ou DT.15 (9µM) ou meio (controle negativo), promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de FSCxSSC foram construídos para seleção das diferentes populações de *L. major* (vivas, mortas e total). Após a seleção, a expressão de anexina V e PI foi determinada pelo posicionamento dos quadrantes em gráficos de pontos de fluorescência 1 (FL1 - FITC) versus fluorescência 3 (FL3 - PercP-Cy5.5).

Os resultados apresentados anteriormente ilustram o perfil celular encontrado e a expressão dos marcadores de morte (anexina V e PI) para apenas uma espécie e concentração de droga. Em seguida, gráficos de barra foram construídos para demonstrar os resultados obtidos para as duas espécies de *Leishmania*, nas diferentes concentrações e tempos de cultura (Figura 24). Em todos os ensaios, realizaram-se 3 experimentos independentes. Os resultados da análise de anexina V e PI foram expressos em taxa de morte. Dessa forma, para cada experimento, os valores obtidos em % da frequência de morte (somatório dos valores de Q1, Q2 e Q3) nos grupos anfotericina B ou DT.15, foram divididos pelo valor encontrado na condição meio. Assim, à taxa de morte encontrada por esse método, não se aplica análise estatística, uma vez que os resultados expressam o aumento em relação ao controle negativo (Meio). Dos valores encontrados para cada experimento independente, foram calculados média e desvio padrão, representando, assim, em um único gráfico, a taxa de morte encontrada para cada tratamento (Figura 24).

Avaliando-se a taxa de morte na espécie de *L. braziliensis*, observa-se na figura 24 que o tratamento com anfotericina B induziu uma alta taxa de morte, principalmente no tempo de 48 horas e na concentração de 1 μ M (Figura 24 – A). Para a droga DT.15, nota-se que houve aumento na taxa de morte na concentração de 3 μ M e principalmente no tempo de 48 horas (Figura 24 – A).

De forma interessante, para a espécie de *L. major* observou-se que a taxa de morte após o tratamento com anfotericina B foi maior no tempo de 24 horas para ambas concentrações da droga (Figura 24 – B e D). Para DT.15, assim como ocorreu com a *L. braziliensis*, o tempo de 48 horas foi mais eficiente na morte do parasito, principalmente na concentração de 9 μ M (Figura 24 – D).

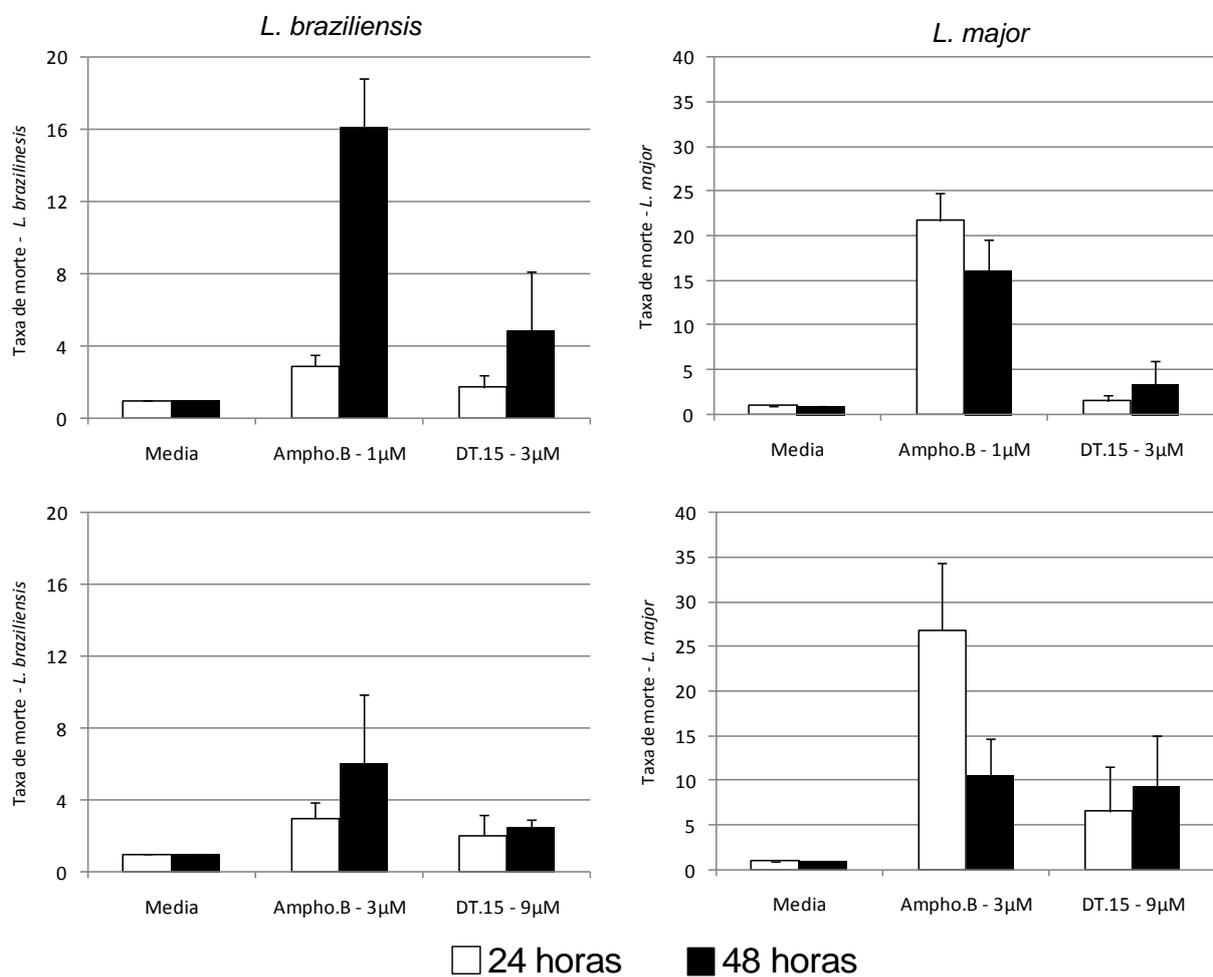


Figura 24: Taxa de morte celular após 24 ou 48 horas de tratamento com DT.15 e anfotericina B em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*.

Promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI). Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 μ M), ou DT.15 (9 μ M) ou meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte (somatório de Q1, Q2 e Q3) obtido para os grupos tratados foi dividido pelo valor encontrado no grupo meio, sendo apresentado como taxa de morte celular. (A e C) representam a taxa de morte encontrada para *L. braziliensis*. (B e D) representam a taxa de morte encontrada para *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativo de 3 experimentos independentes.

Uma outra forma de avaliar a ação leishmanicida proposta nessa tese foi a marcação dos parasitos com CFSE. Sabe-se que quando a célula marcada com CFSE divide, há redução na intensidade média de fluorescência (IMF) emitida por esse marcador. Assim, caso a droga iniba a proliferação celular, a IMF desse marcador permanecerá alta ao longo do tempo de cultura. A figura 25 ilustra os resultados encontrados para esse ensaio experimental na espécie de *L. major*. Pode-se observar que na região de *Leishmania* vivas, os parasitos tratados com DT.15 apresentaram uma IMF maior quando comparado ao grupo meio, principalmente após 48 horas. A curva para anfotericina B praticamente não foi visualizada, uma vez que não houve muitas células presentes nessa região. Quando se avaliou a IMF do CFSE na região de *Leishmania* mortas, observaram-se, basicamente, as células do tratamento com anfotericina B, sendo que o tratamento com DT.15 apresentou uma sobreposição com a curva de anfotericina B, mesmo com um número de eventos menor (Figura 25). Nos histogramas feitos na região de *Leishmania* total, observou-se, mais uma vez, que não houve proliferação dos parasitos, tanto no tempo de 24 horas, quanto no tempo de 48 horas após o tratamento anfotericina B e DT.15 (Figura 25).

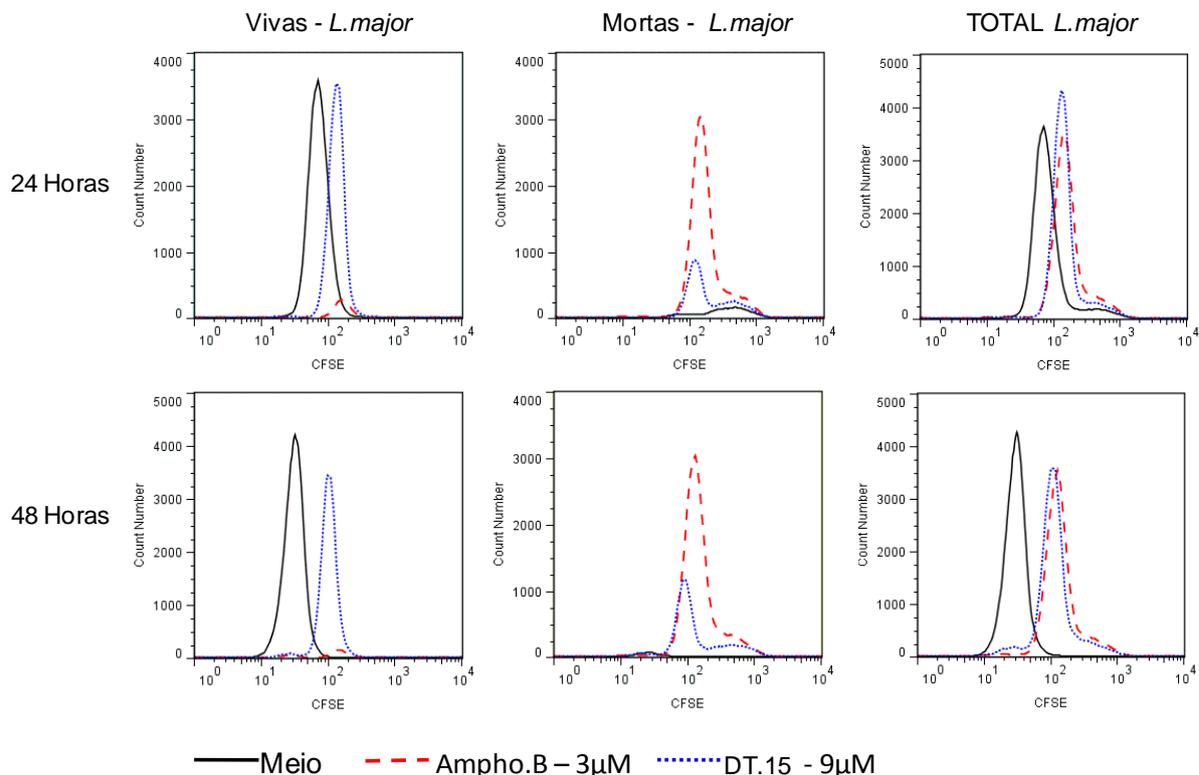


Figura 25: DT.15 inibe proliferação de *L. major* forma semelhante a anfotericina B após 24 e 48 horas de cultura.

Promastigotas de *Leishmania* foram marcadas com CFSE e mantidas em cultura por 24 ou 48 horas com Ampho B (3µM), DT.15 (9µM) ou meio (controle negativo) e analisadas em citômetro de fluxo. Histogramas demonstram a marcação com CFSE para cada população (vivas, mortas e total) nas condições de meio (linha preta), Ampho.B - 3µM (linha vermelha rachurada), ou com DT.15 - 9µM (linha pontilhada azul).

Os resultados apresentados anteriormente ilustram a IMF do CFSE para apenas uma espécie e concentração de droga. Em seguida, construíram-se gráficos de barra para demonstrar os resultados obtidos nas duas espécies de *Leishmania*, nas diferentes concentrações e tempos de tratamento (Figura 26). Em todos os ensaios, foram realizados 3 experimentos independentes. Expressaram-se os resultados da análise da IMF de CFSE em taxa de inibição da proliferação. Dessa forma, para os 3 experimentos, os valores obtidos em IMF, para o canal FL1, nos grupos anfotericina B ou DT.15, foram divididos pelo valor encontrado na condição meio (controle negativo). Assim como na análise de anexina V e PI, quando se realizou esse tipo de análise, não foi necessário aplicar teste estatístico. Dos valores encontrados para cada experimento, foram calculados média e desvio padrão, representando, assim, em um único gráfico, a taxa de inibição da proliferação encontrada para cada tratamento (Figura 26).

Quando se avaliou a taxa de inibição da proliferação na espécie de *L. braziliensis*, como se pode observar na figura 26, em ambas concentrações das drogas, o tempo de 48 horas foi mais eficiente na inibição da proliferação que o tempo de 24 horas (Figura 26- A e C).

Para *L. major* também observou-se que a taxa de inibição da proliferação após o tratamento com anfotericina B e DT.15 foi maior no tempo de 48 horas para ambas concentrações da droga (Figura 26 – B e D). No entanto, nota-se que a variação entre os experimentos foi maior para essa espécie de *Leishmania*.

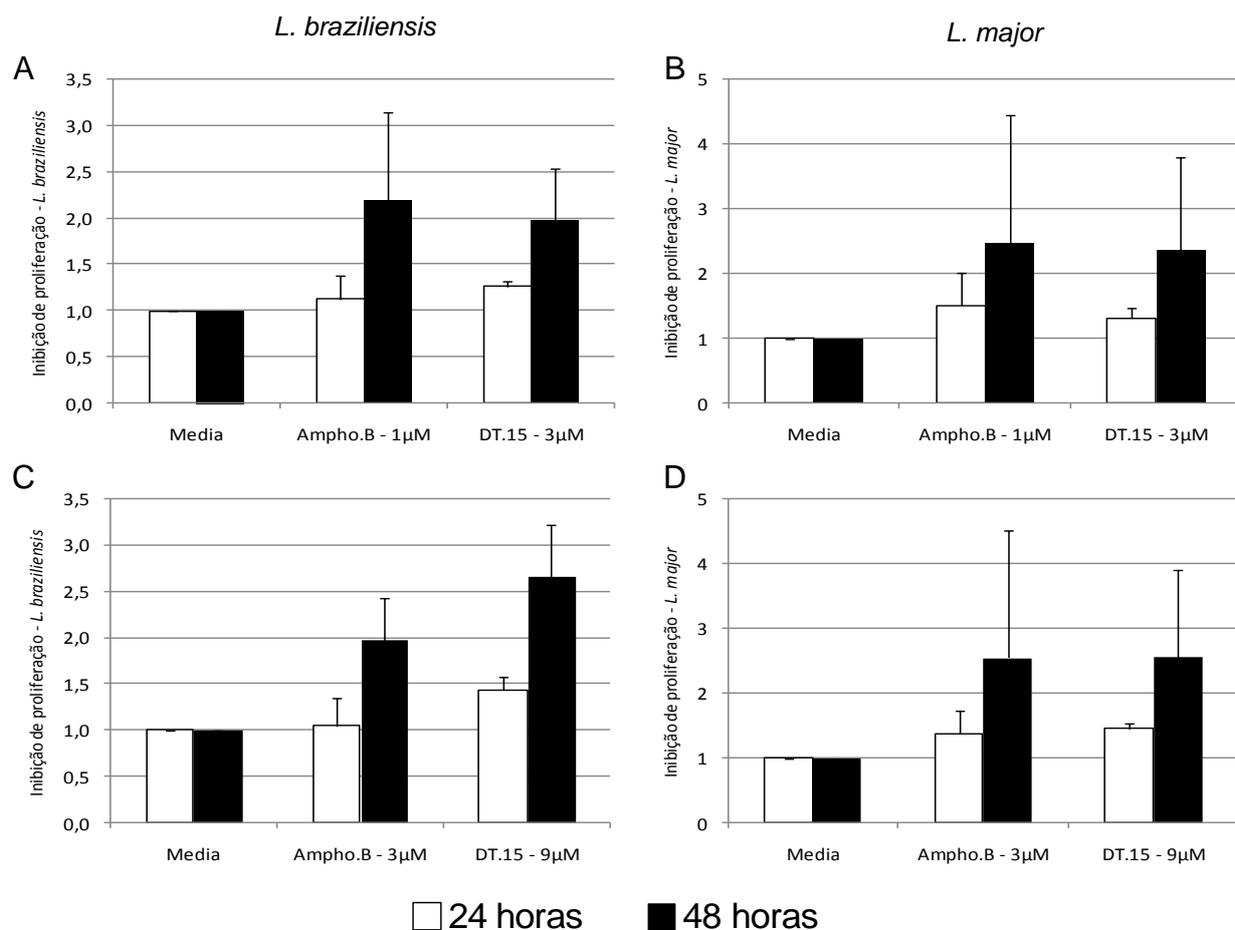


Figura 26: DT.15 inibe a proliferação celular de forma semelhante ao tratamento com anfotericina B após 24 ou 48 horas de culturas em *L. braziliensis* e *L. major*.

Promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para CFSE. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3 μM), ou TD.15 (3 e 9 μM) ou meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da IMF obtido para os grupos tratados foi dividido pelo valor encontrado no grupo meio, sendo apresentado como taxa de inibição da proliferação. (A e C) representa a taxa de inibição da proliferação encontrada para *L. braziliensis*. (B e D) representa a taxa de inibição da proliferação encontrada para *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativo de 3 experimentos independentes.

Na tabela 3 estão sumarizados os resultados encontrados nessa etapa, avaliando-se a ação das drogas nas culturas de *L. braziliensis* e *L. major* em relação ao controle negativo meio.

Tabela 3: Sumário dos resultados do efeito leishmanicida das drogas anfotericina B e DT.15 em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*

Técnica Experimental	[] Drogas	<i>Leishmania braziliensis</i>				<i>Leishmania major</i>			
		Anfotericina B		DT.15		Anfotericina B		DT.15	
		24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs
Contagem em câmara de Neubauer	[] A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	[] B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Diluição Limitante	[] A	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
	[] B	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
Marcação por Anexina V e PI	[] A	+++	+++	++	++	+++	+++	+	+
	[] B	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++
Coloração por CFSE	[] A	+	++	+	++	+	++	+	++
	[] B	+	++	+	++	+	++	+	++

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1 μ M) e DT.15 (3 μ M).

[] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3 μ M) e DT.15 (9 μ M).

+ = BAIXA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.

++ = MÉDIA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.

+++ = ALTA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.

Após a avaliação do efeito leishmanicida das drogas DT.15 e anfotericina B nas culturas de *Leishmania*, realizaram-se experimentos com CMSP de indivíduos saudáveis infectadas *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

5.2.1.2 – Efeito das Drogas Anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em Monócitos de CMSP de Indivíduos Saudáveis Após Infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

O tratamento com as drogas DT.15 e a droga padrão anfotericina B foi, até então, realizado em culturas de *Leishmania*. A partir desses achados, realizou-se o tratamento das CMSP de indivíduos saudáveis infectadas *in vitro* com diferentes espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*. Nessa etapa também avaliou-se o efeito da droga de tratamento padrão Glucantime®. A figura 27 ilustra o desenho experimental utilizado nessa parte dos experimentos.

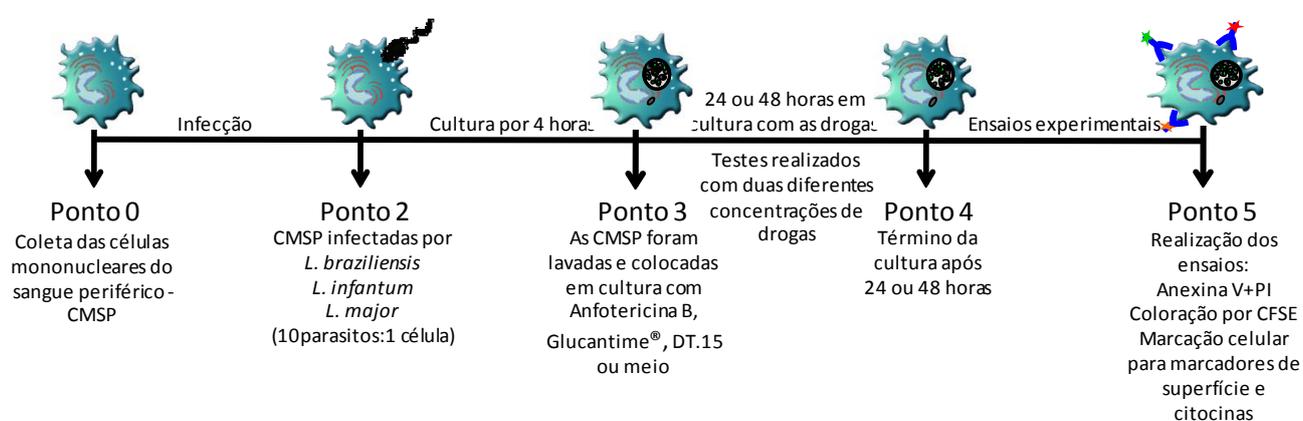


Figura 27: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos das drogas Anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em culturas de CMSP infectadas *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

Para avaliar a citotoxicidade da droga teste DT.15, bem como dos tratamentos convencionais anfotericina B e Glucantime®, realizaram-se experimentos com anexina V e PI para determinação da morte celular, seja por apoptose, necrose ou ambos, no entanto, agora nos monócitos infectados *in vitro* ou não pelas diferentes espécies de *Leishmania*.

Inicialmente, selecionou-se a população de monócitos das CMSP, tanto na ausência ou presença da infecção *in vitro* (Figura 28 e 29, respectivamente). Pode-se observar que houve uma redução no número de monócitos após a infecção (Figura 29) quando comparado com os monócitos não infectados (Figura 28).

De forma bastante interessante, observou-se que a infecção leva a uma redução do número de monócitos e isso pode ser atribuído à maior morte celular, uma vez que a marcação para anexina V e PI foi mais intensa nas células infectadas. Importante

ressaltar que, independentemente da presença ou não do tratamento, a taxa de morte foi alta na infecção. Isso pode ser observado quando se comparou com a condição de meio nas figuras 30 e 31.

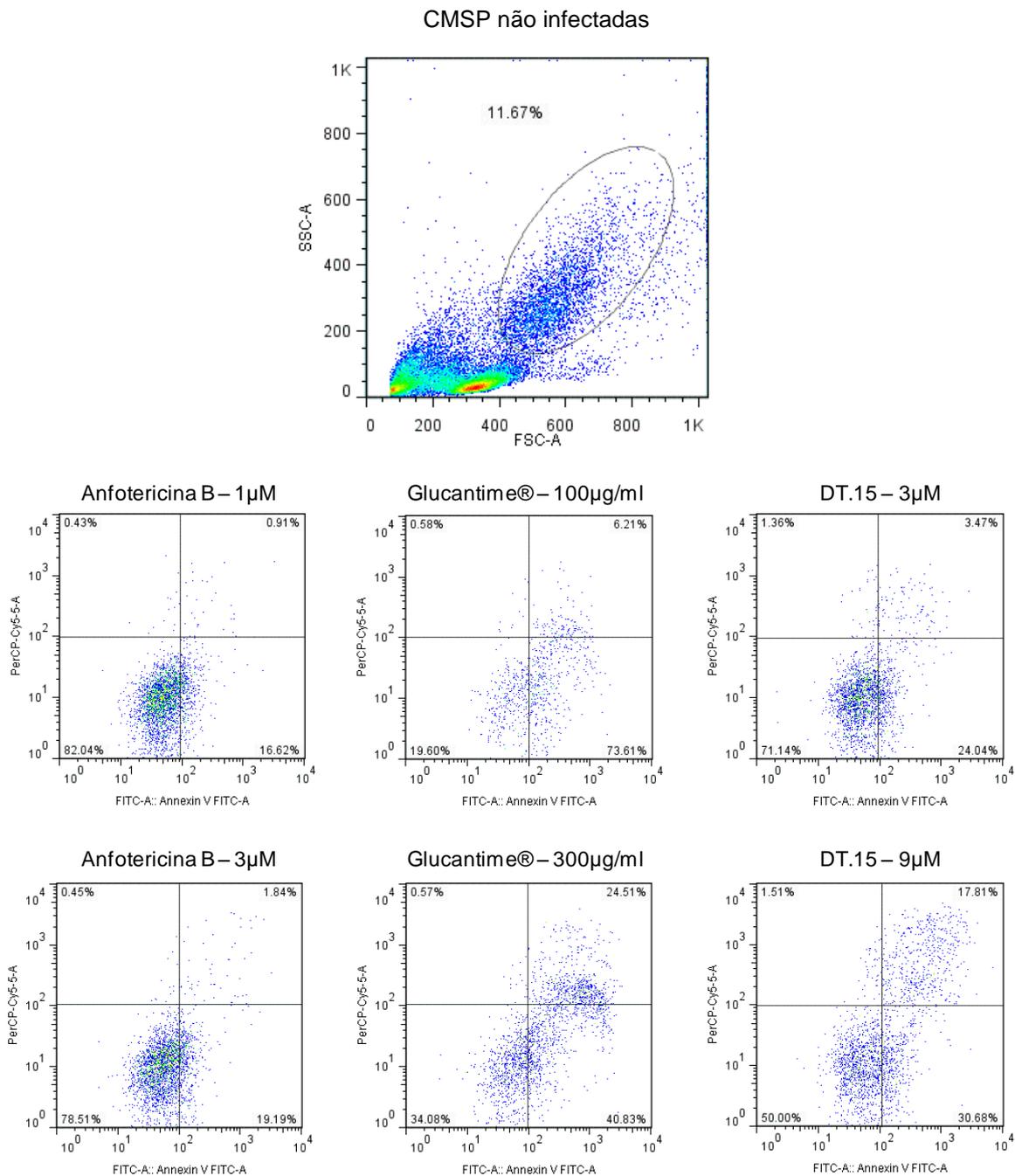


Figura 28: Perfil celular de morte e apoptose de monócitos não infectados após 24 horas de tratamento com Anfotericina B, Glucantime® e DT.15.

CMSP de indivíduos saudáveis foram tratadas com Anfotericina B (3 μM), Glucantime® (300 μg/ml) e DT.15 (9 μM). Após 24 horas de cultura com as drogas ou meio (controle negativo), as CMSP foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de FSCxSSC foram construídos para seleção da população de monócitos. Após a seleção, a expressão de anexina V e PI foi determinada pelo posicionamento dos quadrantes em gráficos de pontos de fluorescência 1 (FL1 - FITC) versus fluorescência 3 (FL3 – PercP-Cy5.5).

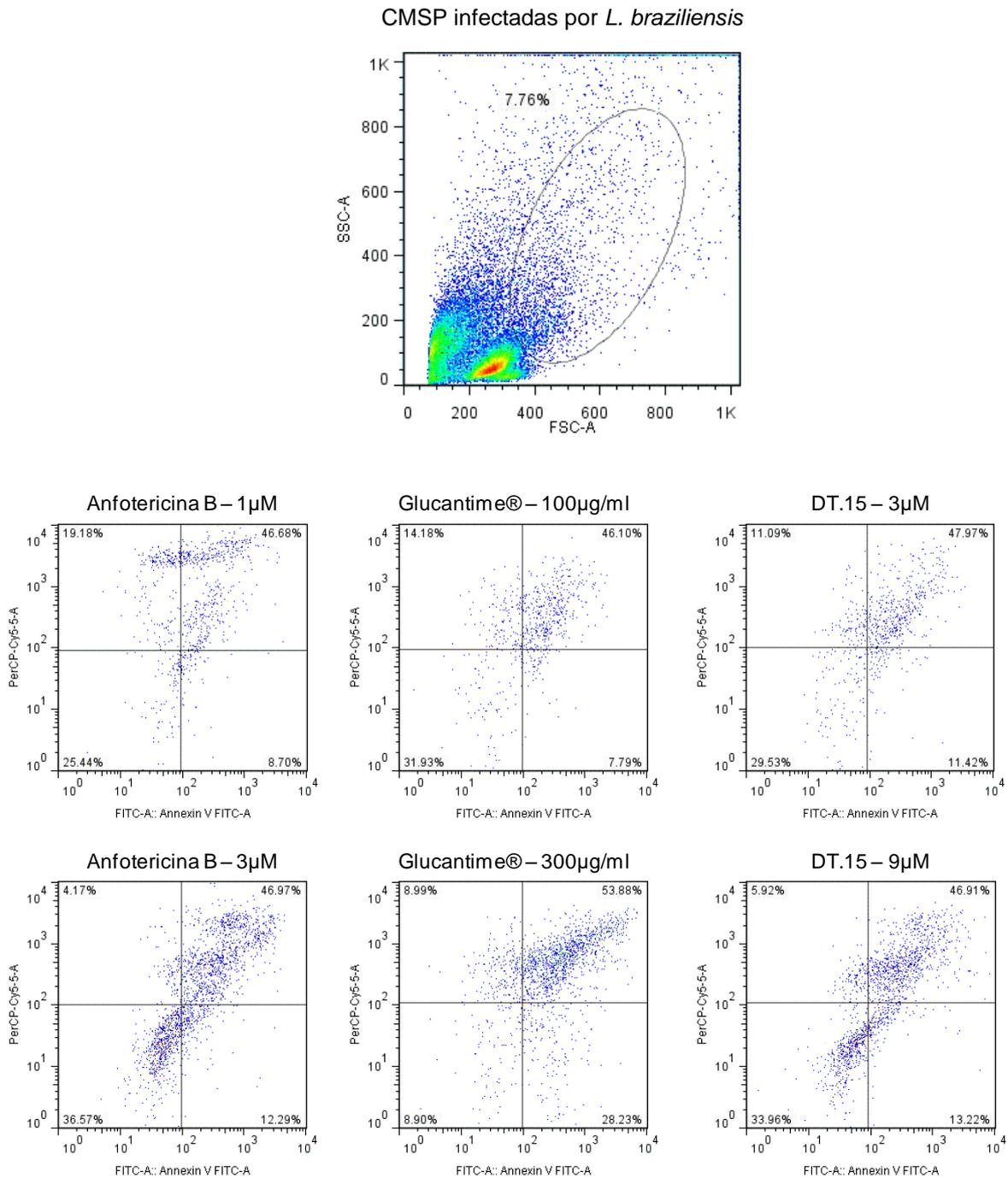


Figura 29: Perfil celular de morte e apoptose dos monócitos de CMSP infectadas *in vitro* por *L. braziliensis* após 24 horas de tratamento com Anfotericina B, Glucantime® e DT.15.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de *Leishmania* e tratadas com Anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM). Após 24 horas de cultura com as drogas ou meio (controle negativo), as CMSP foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de FSCxSSC foram construídos para seleção da população de interesse que são os monócitos. Após a seleção, a expressão de anexina V e PI foi determinada pelo posicionamento dos quadrantes em gráficos de pontos de fluorescência 1 (FL1 - FITC) versus fluorescência 3 (FL3 – PerCP-Cy5.5).

No entanto, as figuras 28 e 29 são representativas das análises realizadas para anexiva V e PI em apenas uma espécie e tempo de cultura. Dessa forma, gráficos de barra com os resultados das 3 espécies de *Leishmania*, nas diferentes concentrações e tempos foram construídos (Figura 30). Os resultados aqui demonstrados são representativos de um número amostral (n) de 3 indivíduos, e o percentual da taxa de morte foi obtido pelo somatório do valor de Q1, Q2 e Q3, como descrito no item 4.2.13 do material e métodos dessa tese.

Como se pode observar, na figura 30 – A, na ausência da infecção, na condição meio, a taxa de morte foi pequena, inferior a 18% para ambos os tempos de tratamento. Quando se comparou essa mesma condição, mas agora com a presença do parasito, a taxa de morte variou entre 30-60%, de forma independente à espécie da *Leishmania* (Figura 30).

Ainda analisando os monócitos não infectados (Figura 30 - A), observaram-se que as drogas anfotericina B e DT.15 apresentaram um comportamento semelhante, com baixa toxicidade no tempo de 24 horas, mas o oposto foi observado no tempo de 48 horas. Com relação a Glucantime®, houve uma alta toxicidade presente após este tratamento (Figura 30 – A).

Com relação aos monócitos infectados, nota-se que não houve diferença entre os tempos e os tipos de tratamento para as células infectadas por *L. braziliensis* (Figura 30 – B). As células infectadas *in vitro* por *L. infantum* e *L. major* apresentaram, no entanto, uma maior taxa de morte após o tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), respectivamente (Figura 30 – C e D).

Na concentração mais alta da droga (Figura 31), observaram-se resultados semelhantes aos encontrados na figura 30. No entanto, nas células não infectadas, o tratamento com DT.15 induziu uma maior morte desses monócitos (Figura 31 – A). Nos monócitos infectados por *L. major*, notou-se que o tratamento com Glucantime® também apresentou uma alta taxa de morte, superior ao controle negativo (Figura 31 – D).

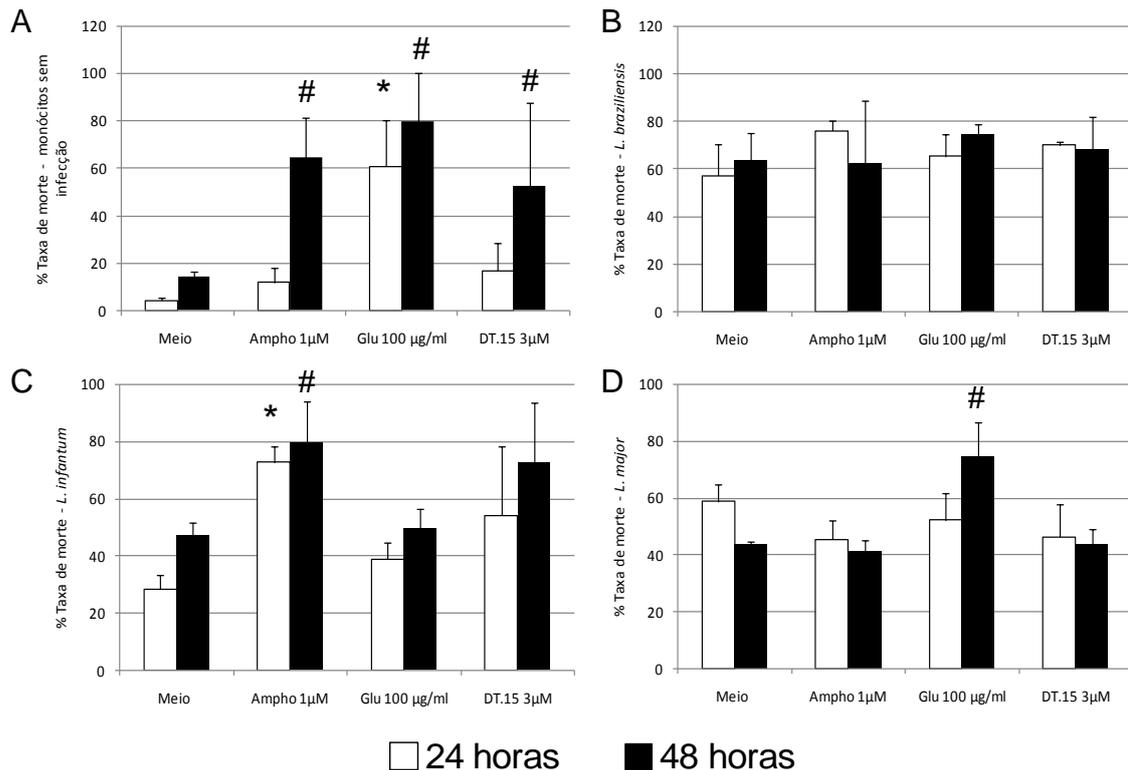


Figura 30: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15, em culturas de CMSP infectadas *in vitro* ou não com as espécies de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* ou não com 3 diferentes espécies de *Leishmania* e marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI). Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1µM), Glu. (100µg/ml), DT.15 (3µM) ou meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte, em %, foi obtido pelo somatório de Q1, Q2 e Q3, como descrito na metodologia. (A) representa a taxa de morte dos monócitos não infectados. (B, C e D) representam a taxa de morte encontrada para os monócitos provenientes de CMSP infectadas por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

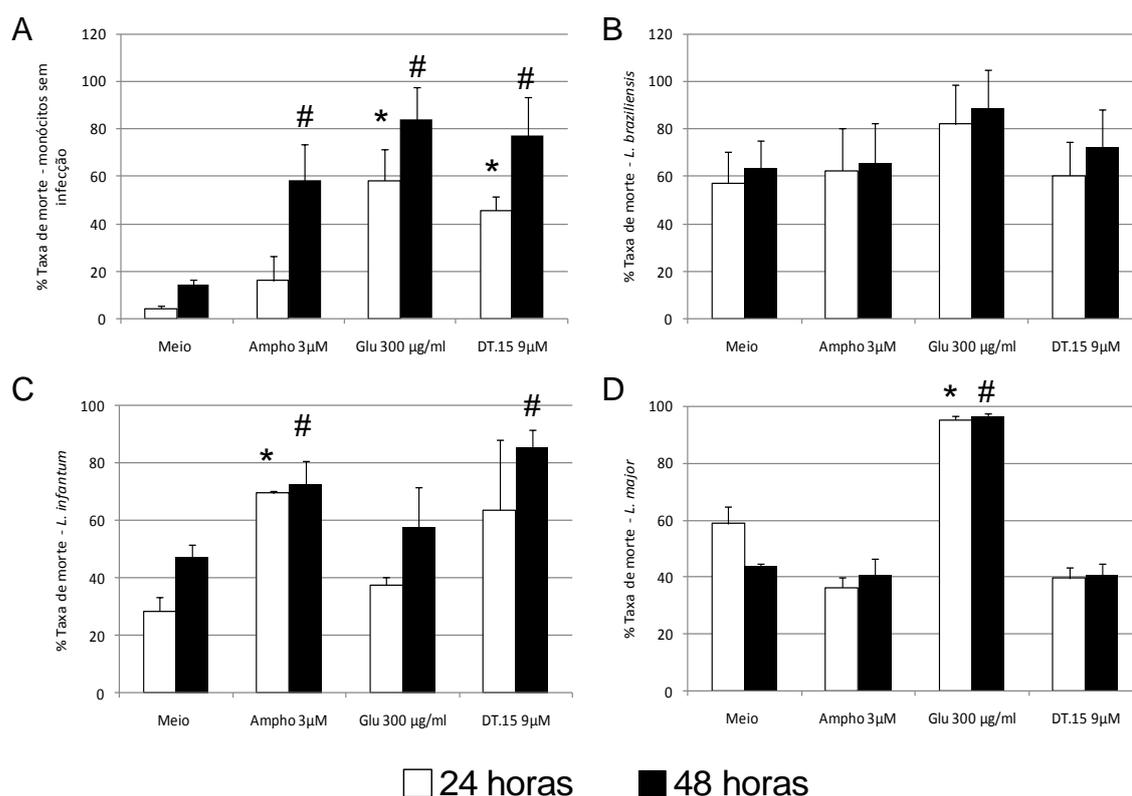


Figura 31: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15, em culturas de CMSP infectadas *in vitro* ou não com as espécies de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* ou não com 3 diferentes espécies de *Leishmania* e marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI). Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3µM), Glu. (300µg/ml), DT.15 (9µM) ou meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte, em %, foi obtido pelo somatório de Q1, Q2 e Q3, como descrito na metodologia. (A) representa a taxa de morte dos monócitos não infectados. (B, C e D) representam a taxa de morte encontrada para os monócitos provenientes de CMSP infectadas por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Outra proposta utilizada nesse estudo para avaliação da ação leishmanicida foi a coloração do parasito por CFSE e posterior infecção *in vitro* nas CMSP de indivíduos saudáveis. Nesse ensaio, hipotetizou-se que a IMF do CFSE reduziria quanto maior fosse a ação leishmanicida da droga, uma vez que a redução na IMF desse marcador indicaria a morte do parasito no interior das células infectadas. Na figura 32, pode-se visualizar uma alta taxa de infecção dos monócitos provenientes de CMSP, sendo superior a 80%, e independente do tratamento (Figura 32).

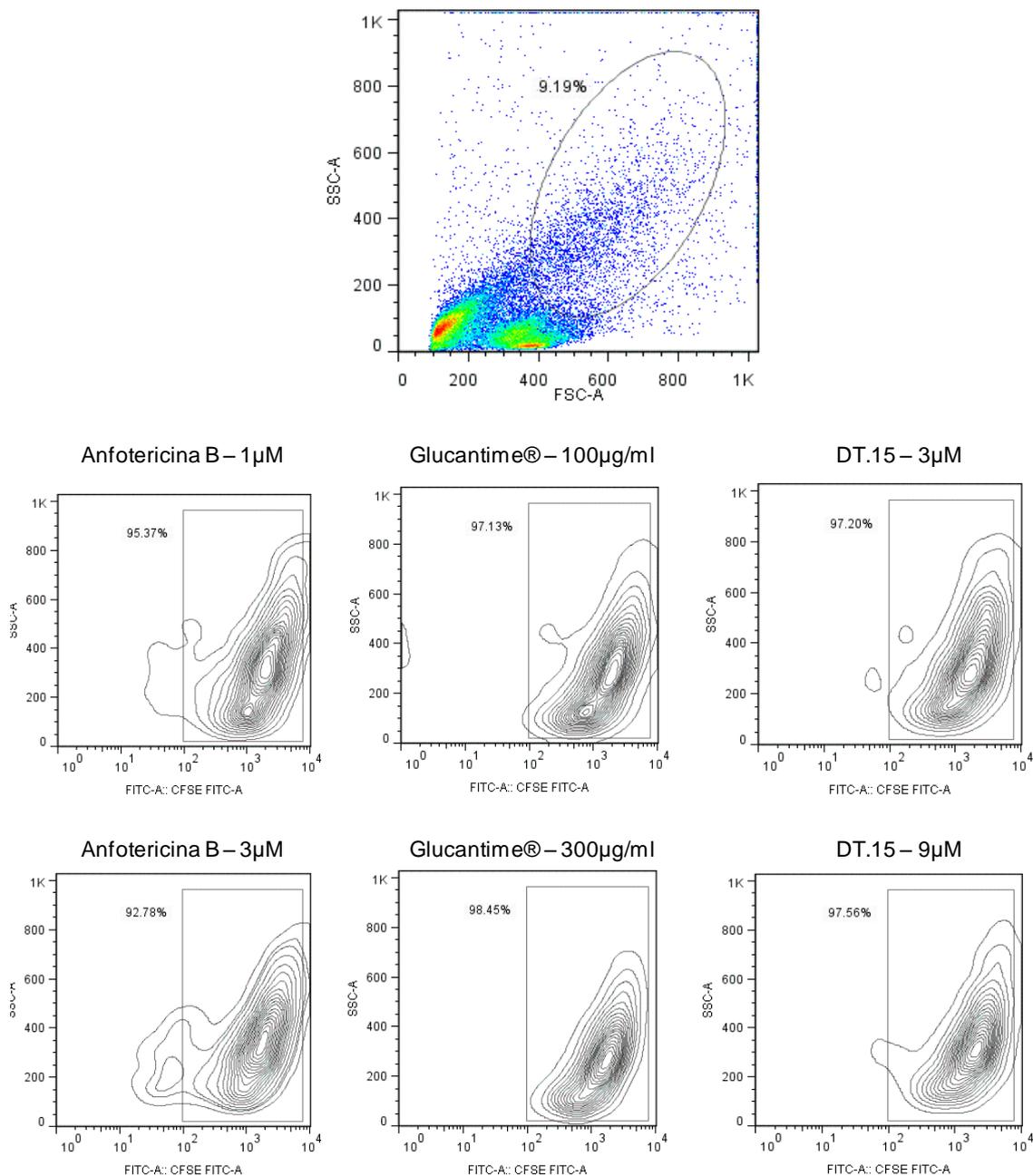


Figura 32: Perfil de infecção dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L.braziliensis*, *L.infantum* e *L.major* após de 24 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15.

Monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis foram infectados *in vitro* por 3 diferentes espécies de *Leishmania* marcadas com CFSE e, após infecção, mantidas em cultura por 24 horas com Ampho B (1 e 3μM), Glu. (100 ou 300μg/ml), DT.15 (3 e 9μM) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de tamanho *versus* granuloso (FSCxSSC) foram construídos para seleção dos monócitos. Em seguida, gráficos de densidade plotando SSC *versus* fluorescência 1 (FL1 - FITC) demonstram a frequência de infecção nos monócitos em cada tratamento.

Para comprovar que não houve diferença da taxa de infecção, avaliou-se a frequência de infecção nos monócitos infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania* submetidos aos tratamentos com as drogas. Infelizmente, para essa análise, as células infectadas por *L. infantum*, no tempo de 48 horas foram perdidas. Dessa forma, realizou-se a análise no tempo de 24 horas para essas células (Figura 33 – B e E). O percentual da taxa de infecção nos monócitos infectados *in vitro* pelas diferentes espécies e submetidos aos tratamentos, nos tempos de 24 e 48 horas foi semelhante, indicando que não houve diferença na taxa de infecção (Figura 33).

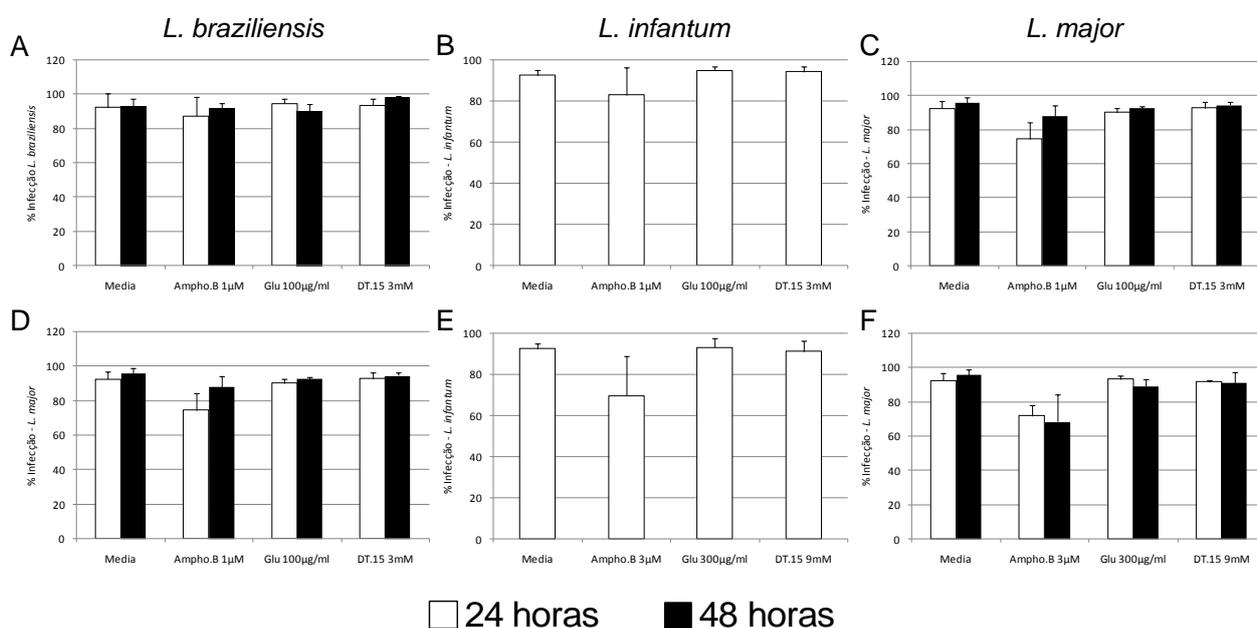


Figura 33: Infecção dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania* marcadas com CFSE. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3µM), Glu. (100 e 300µg/ml), DT.15 (3 e 9µM) ou meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam a taxa de infecção dos monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam a taxa de infecção dos monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam a taxa de infecção dos monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com número amostral de 3 indivíduos para cada grupo.

Apesar da taxa de infecção similar (Figura 33), quando se analisou a intensidade média de fluorescência (IMF) para CFSE, observou-se que, no tempo de 48 horas, houve um aumento na IMF desse marcador para os monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* e *L. major* (Figura 34 A e D; C e F, respectivamente). As amostras infectadas por *L. infantum*, no tempo de 48 horas, foram perdidas, o que impossibilitou sua análise (Figura 34 - B e E).

Importante ressaltar que para as células infectadas por *L. major* e tratadas com anfotericina B encontrou-se uma redução na IMF quando comparado ao controle negativo (Figura 34 – C). Resultado similar foi observado em ambos os tempos, na concentração de 3µM (Figura 34 – F). Para os demais tratamentos, não foram encontradas diferenças em relação ao controle negativo (Figura 34).

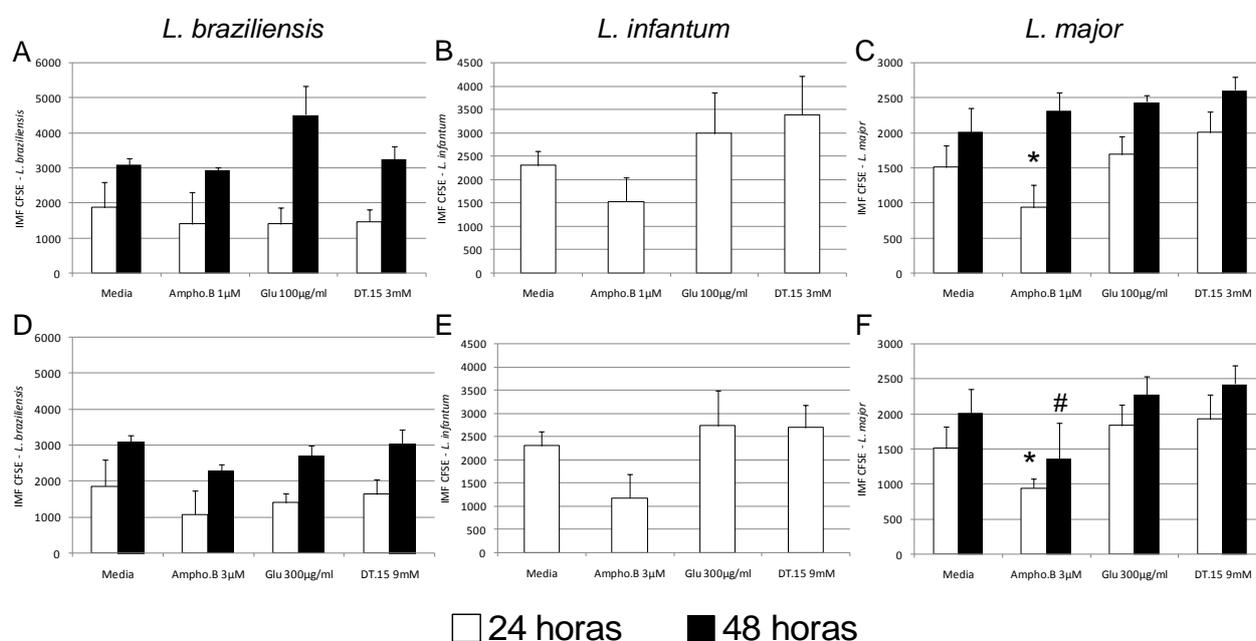


Figura 34: Intensidade média de fluorescência do CFSE em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B, Glucantime® e DT.15.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania* marcadas com CFSE. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3µM), Glu. (100 e 300µg/ml), TD.15 (3 e 9µM) ou meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições de tratamento *versus* o controle negativo Meio para o tempo de 24 horas e # para o tempo de 48 horas (p< 0,05).

Os ensaios realizados, até o momento, em monócitos provenientes de CMSP sugeriram que a droga teste DT.15 não induziu elevada toxicidade e morte quando comparada as drogas padrões.

Na tabela 4 encontra-se o sumário dos resultados obtidos nos experimentos de avaliação da morte celular (anexina V+PI), e coloração com CFSE (Tabela 4).

Tabela 4: Sumário de resultados da morte celular e infecção após 24 e 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

Técnica Experimental	[] Droga	<i>Leishmania braziliensis</i>						<i>Leishmania infantum</i>						<i>Leishmania major</i>					
		Ampho.B		Glu.		DT.15		Ampho.B		Glu.		DT.15		Ampho.B		Glu.		DT.15	
		24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs
Anexina V e PI	[] A	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-
	[] B	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	↑	-	-	↑	↑	-	-
Coloração por CFSE	[] A	-	-	-	-	-	-	-	§	-	§	-	§	-	-	-	-	-	-
	[] B	-	-	-	-	-	-	-	§	-	§	-	§	-	-	-	-	-	-

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1µM) e DT.15 (3µM).

[] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3µM) e DT.15 (9µM).

- = SEM alterações na morte celular por anexina V+PI ou na IMF do marcador CFSE em relação ao controle negativo Meio.

↓ = REDUÇÃO na morte celular por anexina V+PI ou na IMF do marcador CFSE em relação ao controle negativo Meio.

↑ = AUMENTO na morte celular por anexina V+PI ou na IMF do marcador CFSE em relação ao controle negativo Meio.

§ = Amostra perdida

Com o intuito de melhor caracterizar como essas drogas atuam no modelo de infecção *in vitro* com diferentes espécies de *Leishmania*, em diferentes tempos de cultura e concentrações das drogas, realizou-se o ensaio de imunofenotipagem, para marcadores de superfície, como moléculas co-estimuladoras, e citocinas intracelulares, nos subtipos de monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻.

Os monócitos presentes no sangue periférico têm um importante papel, como citado na revisão da literatura dessa tese. Dessa forma, avaliou-se a resposta de dois subtipos de monócitos: monócitos CD14⁺CD16⁺, denominados como não clássicos e monócitos CD14⁺CD16⁻, denominados como clássicos (Strauss-Ayali, Conrad et al. 2007). Com o intuito de padronizar a apresentação desses resultados, organizaram-se as figuras da seguinte maneira: a primeira linha de cada figura (gráficos A, B e C) representa os resultados encontrados para a subpopulação de monócitos CD14⁺CD16⁺, e a segunda linha (gráficos D, E e F) representa os resultados encontrados para o subtipo CD14⁺CD16⁻. Além disso, como se realizaram os experimentos com 3 espécies de *Leishmania*, a 1^a, 2^a e 3^a colunas são os resultados obtidos para as infecções por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. Assim, todos os resultados foram apresentados dessa forma.

Apesar da grande quantidade de figuras demonstradas, a escolha por essa apresentação deve-se ao fato de que diferenças de comportamento entre as espécies de *Leishmania* foram visualizadas. Esse tipo de descrição dos dados não seria possível sem a apresentação dos gráficos nesse modelo.

Os marcadores de ativação foram as primeiras moléculas avaliadas. Na figura 35 e 36 observaram-se os resultados obtidos com relação a expressão de CD11b em ambos os subtipos de monócitos.

Na figura 35, a expressão de CD11b em monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. infantum* foi maior no tratamento com anfotericina quando comparado ao meio (Figura 35 – B). Não houve diferença entre os diferentes tratamentos para as infecções por *L. braziliensis* e *L. major*. No entanto, na descrição dos dados, é importante ressaltar que a expressão de CD11b nos monócitos não ocorreu da mesma maneira quando submetidos a infecção *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania*. Quando se avaliou a expressão de CD11b nos monócitos infectados por *L. braziliensis*, nota-se que sua expressão foi alta no tempo de 24 horas, reduzindo no tempo de 48 horas (Figura 35 – A). O contrário foi observado nos monócitos infectados por *L. major* (Figura 35 – C).

No subtipo CD14⁺CD16⁻, a expressão de CD11b nos monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* tratados por DT.15 foi menor quando comparada ao controle no tempo

de 24 horas (Figura 35 – D). Mais uma vez, observa-se que a expressão desse marcador variou de acordo com a espécie de *Leishmania* utilizada para infecção *in vitro*.

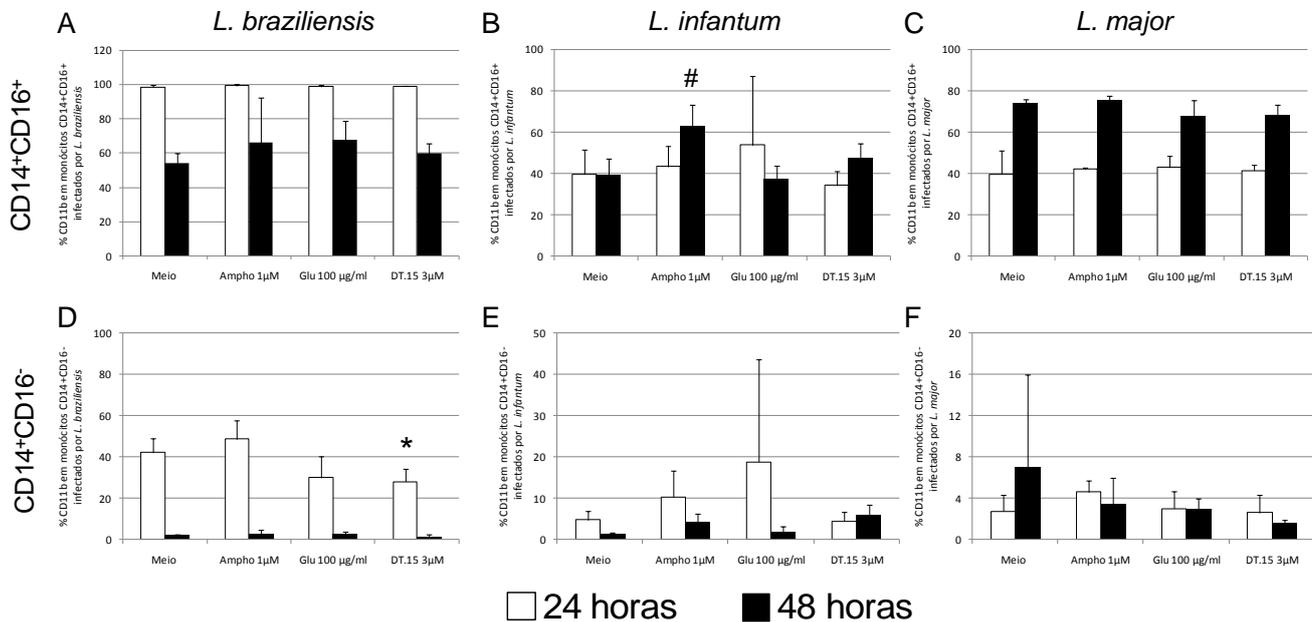


Figura 35: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD11b e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Os resultados obtidos para a concentração de droga 3 vezes maior (Figura 36), foram bastante semelhantes aos da figura 35. Para o subtipo de monócito CD14+CD16+, a expressão de CD11b foi maior no tratamento com Glucantime® nas infecções *in vitro* por *L. braziliensis* e *L. major* (Figura 36 - A e C). Na infecção por *L. infantum*, também houve aumento na expressão de CD11b após tratamento com anfotericina B (Figura 36 – B). O tratamento com DT.15, no entanto, apresentou redução na expressão de CD11b nas células infectadas *in vitro* por *L. major* (Figura 36 – C). Assim, como no subtipo CD14+CD16+, os monócitos CD14+CD16- apresentaram aumento na expressão de CD11b após tratamento com Glucantime® em relação ao meio (Figura 36 – F). Nota-se mais uma vez que a expressão de CD11b foi distinta de acordo com a espécie de *Leishmania* utilizada para infecção *in vitro* (Figura 36 – A e C).

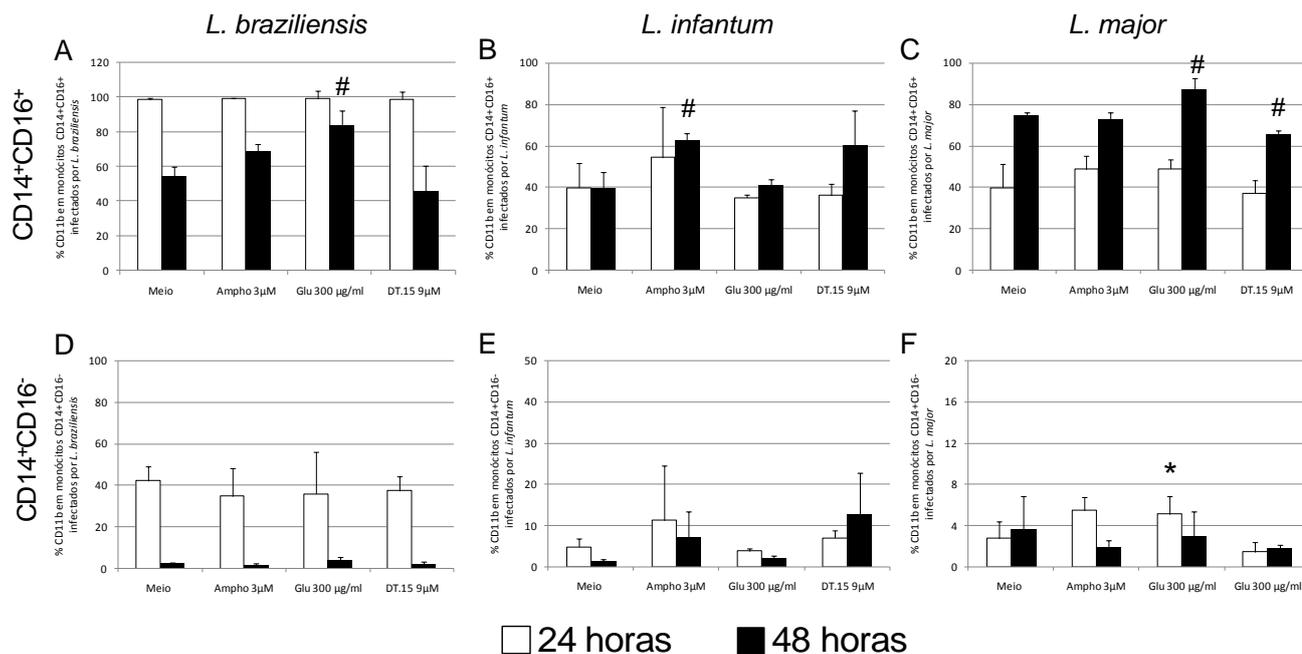


Figura 36: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), DT.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD11b e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

O marcador CD80 também foi avaliado. Essa molécula co-estimuladora, conhecida como B7-1, não apresentou diferença na expressão entre os diferentes tratamentos nos dois subtipos de monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* avaliados (Figura 37 – A e D). Com relação às células infectadas por *L. infantum*, houve redução na expressão de CD80 em monócitos CD14⁺CD16⁺ tratados com anfotericina B e Glucantime® em relação ao controle após 24 horas de cultura (Figura 37 – B). Nas células infectadas por *L. major*, enquanto houve aumento da expressão de CD80 após o tratamento de 48 horas com anfotericina B, o oposto foi visualizado no tratamento com DT.15 (Figura 37 – C). Para a subpopulação CD14⁺CD16⁻ não encontraram-se diferenças entre os tratamentos nas células infectadas *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 37 – D, E e F). Mais uma vez, nota-se a diferença no perfil de expressão para esses marcadores nos monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* e *L. major*, principalmente com relação ao tempo de cultura (Figura 37 – A e C).

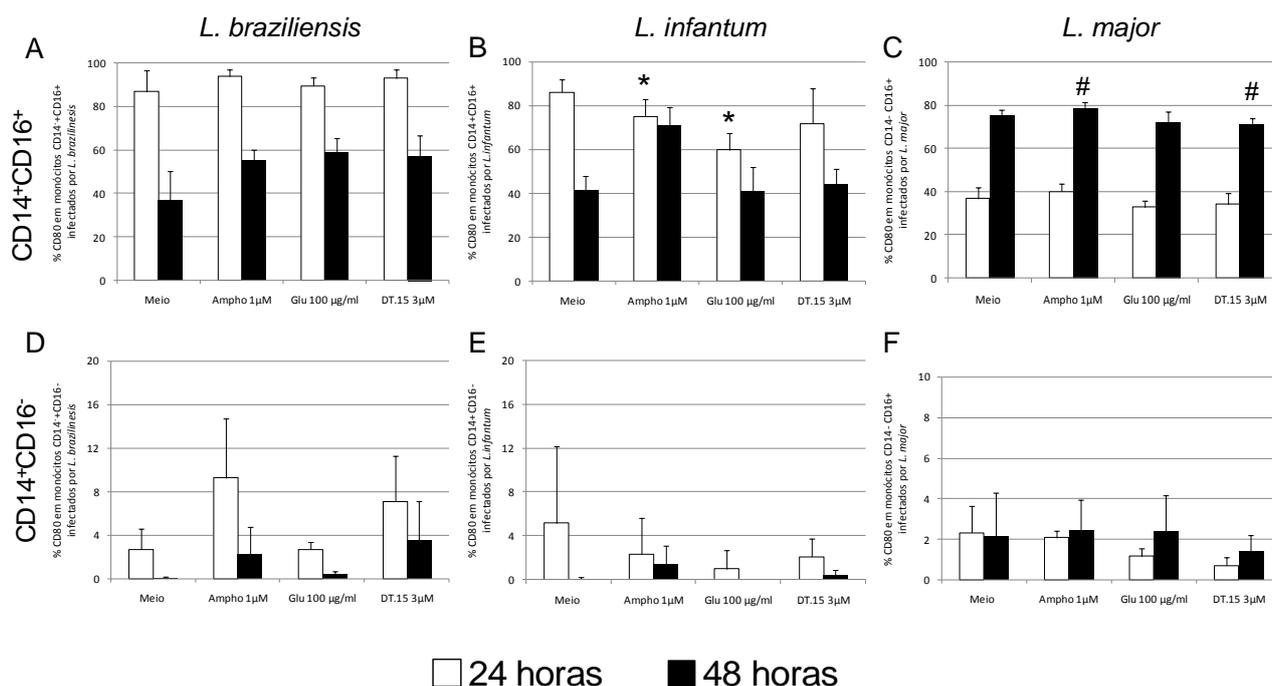


Figura 37: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD80 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Na concentração 3 vezes maior de droga, encontraram-se resultados semelhantes aos anteriores. Não houve diferença na expressão de CD80 em monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* nos dois subtipos celulares (Figura 38 – A e D). Já para os monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* por *L. infantum*, os três tipos de tratamentos apresentaram redução na expressão desse marcador em relação ao controle (Figura 37 – B). Esse subtipo de monócitos infectado *in vitro* por *L. major* apresentou aumento na expressão de CD80 nas células tratadas com Glucantime®, mas, novamente, observou-se redução na expressão desse receptor após o tratamento com DT.15 (Figura 37 – C). Não se encontraram diferenças entre os tratamentos para o subtipo de monócitos CD14⁺CD16⁻ (Figura 38 – D, E e F).

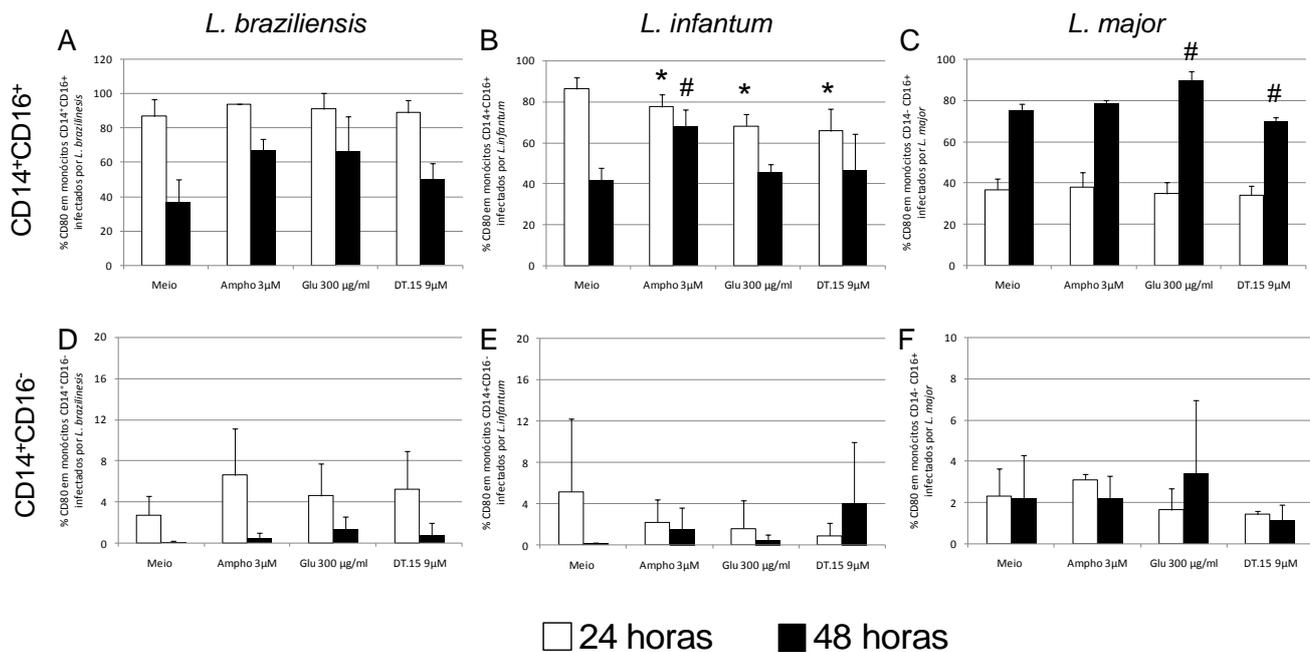


Figura 38: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), DT.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD80 e os dados foram coletados utilizando um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Outro marcador de ativação avaliado foi CD86, denominado também B7-2. Não se encontrou diferenças entre os tratamentos na subpopulação CD14⁺CD16⁻ nas células infectadas *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 39). No tempo de 24 horas, observaram-se que as células infectadas *in vitro* por *L. infantum* e *L. major*, e tratadas com anfotericina B apresentaram uma maior expressão desse receptor (Figura 39 – B e C). Ainda no tempo de 24 horas, houve redução na expressão de CD86 nos monócitos infectados *in vitro* por *L. infantum* e tratados com Glucantime® em relação a condição meio (Figura 39 – B). No tempo de 48 horas nas células infectadas por *L. major*, encontraram-se diferenças em relação ao meio, nos tratamentos com anfotericina B e Glucantime®, com aumento e redução na expressão de CD86, respectivamente (Figura 39 – C).

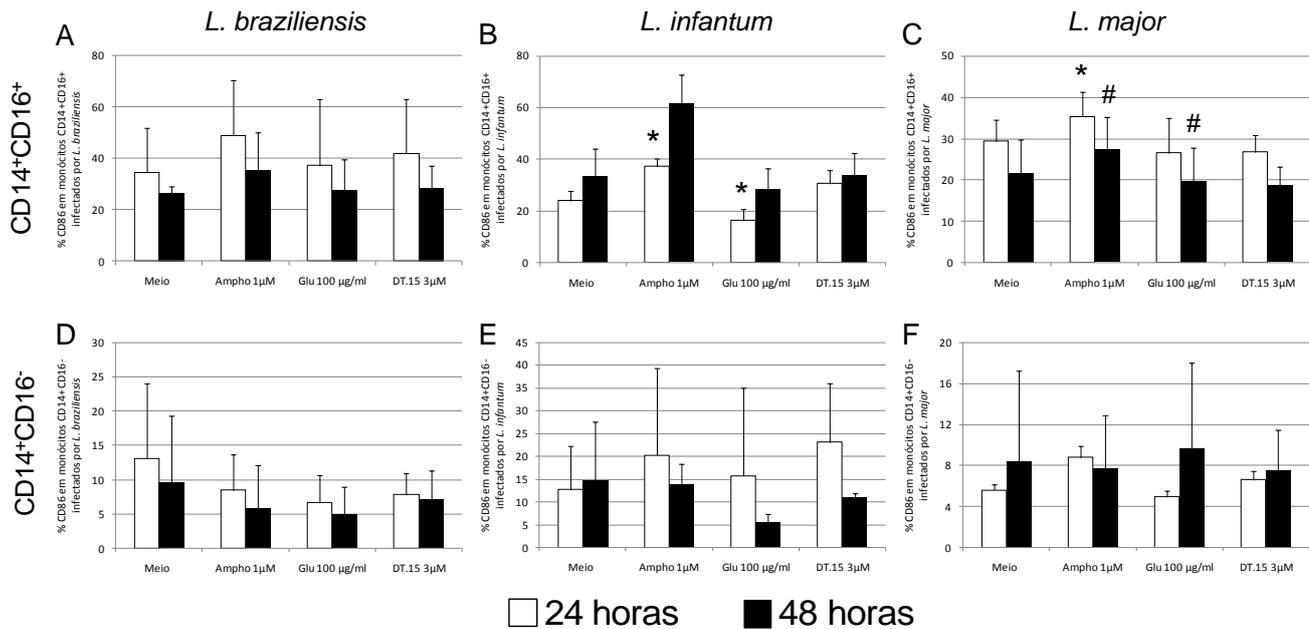


Figura 39: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD86 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Quando se avaliou a expressão de CD86 na concentração 3 vezes maior da droga, pode-se observar que, no tempo de 24 horas, o tratamento com anfotericina B levou a um aumento na expressão desse marcador nos monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 40 – A, B e C). No tempo de 48 horas, encontraram-se resultados semelhantes nas infecções *in vitro* por *L.infantum* e *L.major* (Figura 40 – B e C). Na infecção por *L. infantum*, houve redução na expressão de CD86 nesse subtipo de monócito após o tratamento com DT.15 (Figura 40 – B), assim como nas células infectadas *in vitro* por *L. major* após o tratamento com Glucantime® (Figura 40 – C).

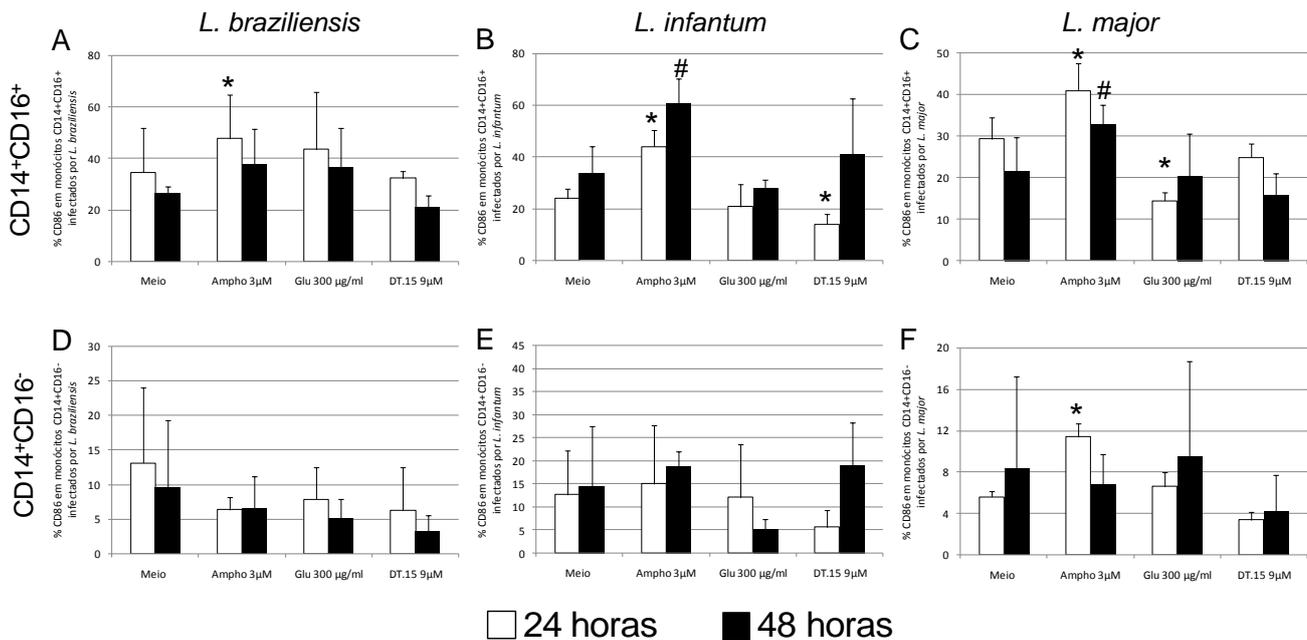


Figura 40: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), DT.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD86 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Com relação a intensidade média de fluorescência (IMF) para o marcador HLA-DR, encontraram-se diferenças apenas no tempo de 48 horas nos monócitos CD14+CD16- infectados *in vitro* por *L. braziliensis* e tratados com DT.15 (9µM) em relação meio (Figura 41 – D). Na descrição dos dados, observa-se de forma bastante interessante, como o comportamento dos monócitos infectados *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* variou, especialmente quando se compararam as células infectadas por *L. braziliensis* e *L. major* (Figura 41).

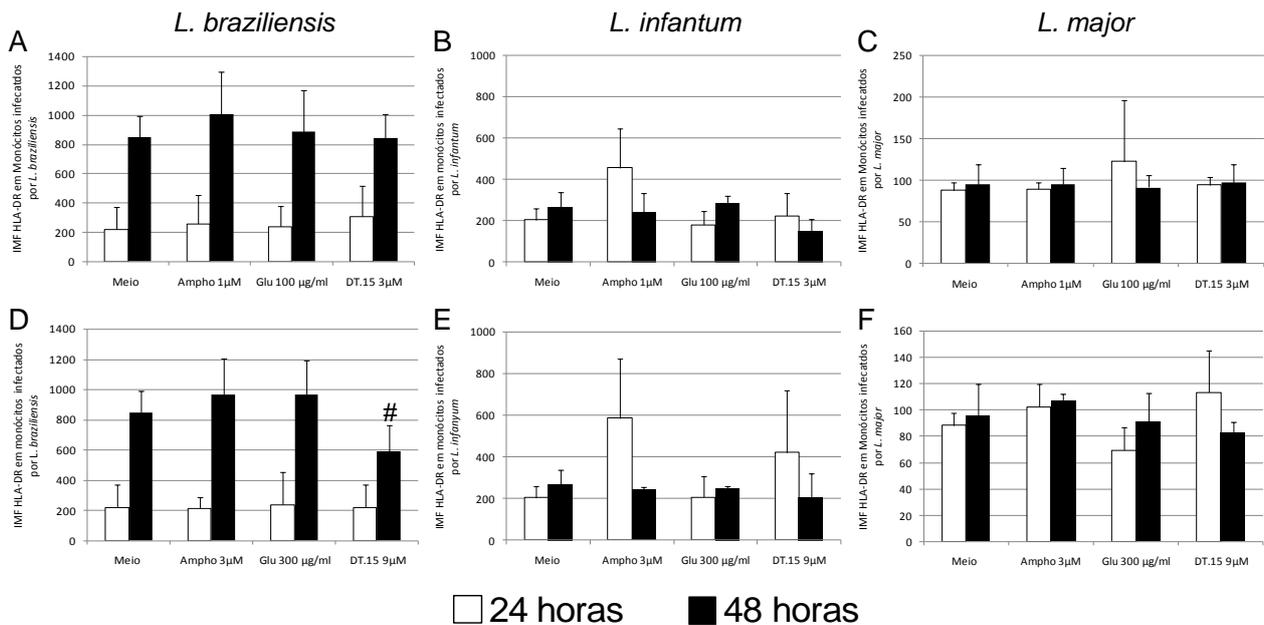


Figura 41: Intensidade média de fluorescência de HLA-DR em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1 e 3 µM), Glucantime® (100 e 300 µg/ml) e DT.15 (3 e 9 µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3 µM), Glu. (100 e 300 µg/ml), DT.15 (3 e 9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e HLA-DR e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Após avaliar os marcadores de superfície, verificou-se a expressão de citocinas intracelulares TNF, IL-6, IL-12 e IL-10. A primeira analisada foi TNF em monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻. Com relação as diferenças encontradas entre os tratamentos, observou-se que após o tratamento com DT.15, os monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. braziliensis* e *L. major* foram capazes de reduzir a expressão dessa citocina no tempo de 48 horas (Figura 42 – A e C). Não se encontraram outras diferenças entre os tratamentos no subtipo de monócitos CD14⁺CD16⁻. Nota-se, de forma interessante, que a produção dessa citocina variou de acordo com a espécie de *Leishmania* infectante. Por exemplo, as células CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L. braziliensis* produziram mais citocinas no tempo de 48 horas, enquanto nas células infectadas *in vitro* por *L. major*, a produção foi maior no tempo de 24 horas, reduzindo no tempo de 48 horas (Figura 42- A e C). No entanto, nas células CD14⁺CD16⁻ observou-se o contrário na infecção *in vitro* por *L. major* (Figura 42 – F).

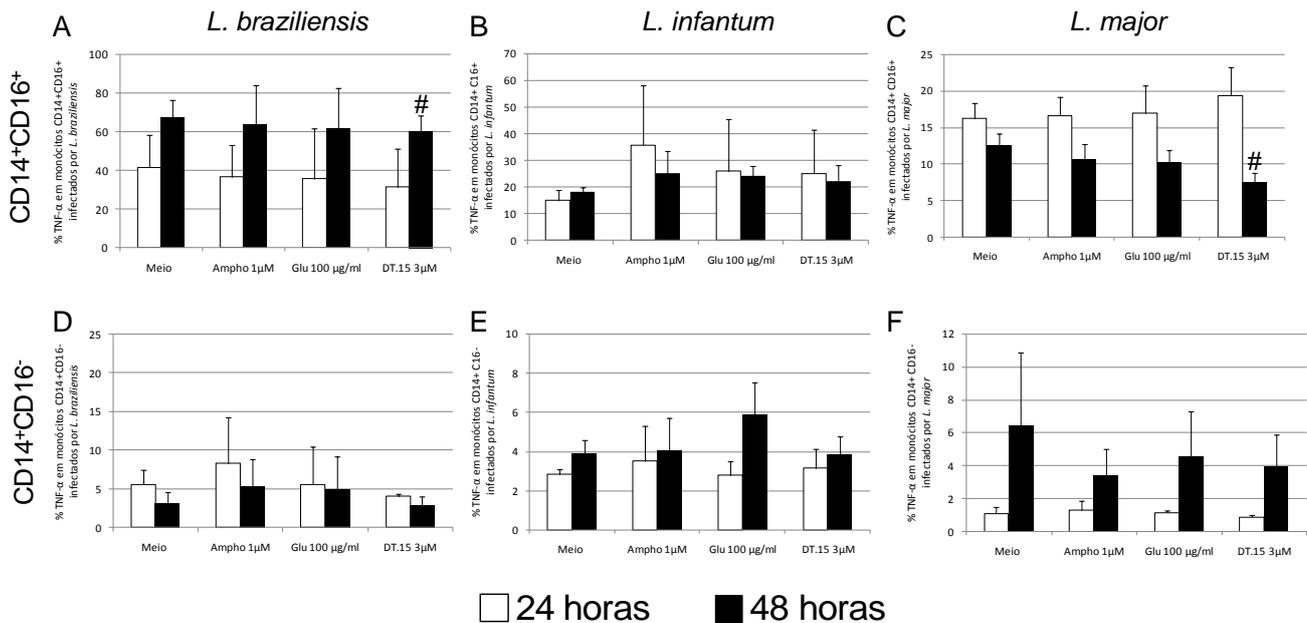


Figura 42: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e TNF e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Quando se avaliou a expressão de TNF em uma concentração 3 vezes maior de drogas, nos monócitos CD14+CD16+ infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, o tratamento com Glucantime® aumentou a expressão dessa citocina no tempo de 24 horas em comparação ao controle meio (Figura 43 – A). Nos monócitos infectados por *L. infantum*, tanto do subtipo CD14+CD16+ quanto CD14+CD16-, o tratamento com Glucantime® aumentou a expressão dessa citocina no tempo de 48 horas em relação ao controle negativo meio (Figura 43 – B e E).

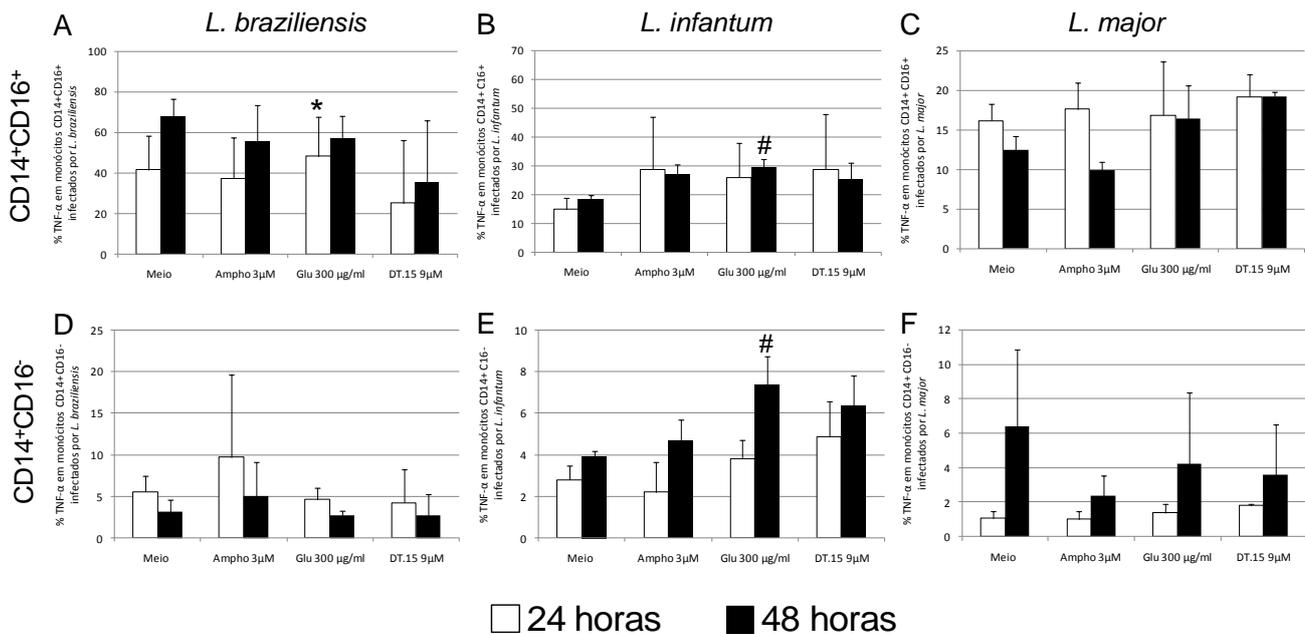


Figura 43: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), DT.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e TNF e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

A segunda citocina avaliada foi IL-6. A expressão intracelular nos dois subtipos de monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* não apresentou diferença entre os tratamentos avaliados (Figura 44 – A e D). Nas células infectadas por *L. infantum*, o tratamento com anfotericina B induziu um aumento na expressão de IL-6 tanto em monócitos CD14+CD16+ quanto nos CD14+CD16- no tempo de 48 horas (Figura 44 –B e E). Nesse último subtipo de monócito, também encontrou-se aumento na expressão de IL-6 nas células tratadas com DT.15 em relação ao controle meio (Figura 44 – E). Nos monócitos CD14+CD16-, infectados *in vitro* por *L. major*, o tratamento com DT.15 reduziu a expressão dessa citocina no tempo de 48 horas (Figura 44 – C).

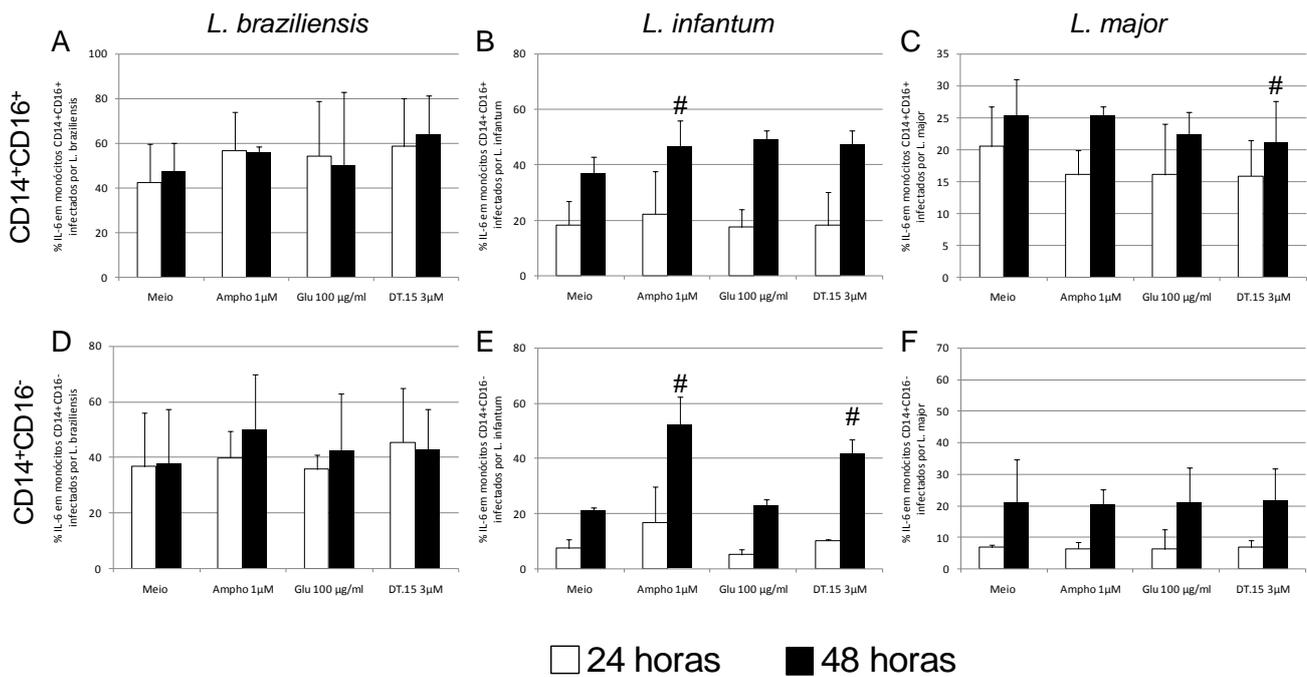


Figura 44: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-6 e os dados foram coletados utilizando um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Ainda avaliando-se a expressão de IL-6, agora em uma concentração 3 vezes maior de drogas, não se encontraram diferenças entre os tratamentos nos dois subtipos de monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (Figura 45 – A e D). Já nas células CD14+CD16+ infectadas por *L. infantum*, o tratamento com Glucantime® e DT.15, no tempo de 48 horas, levou a um aumento da expressão de IL-6 em relação ao controle (Figura 45 – B). Neste subtipo celular, nos monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, o tratamento com DT.15 induziu uma queda na expressão dessa citocina (Figura 45 – C).

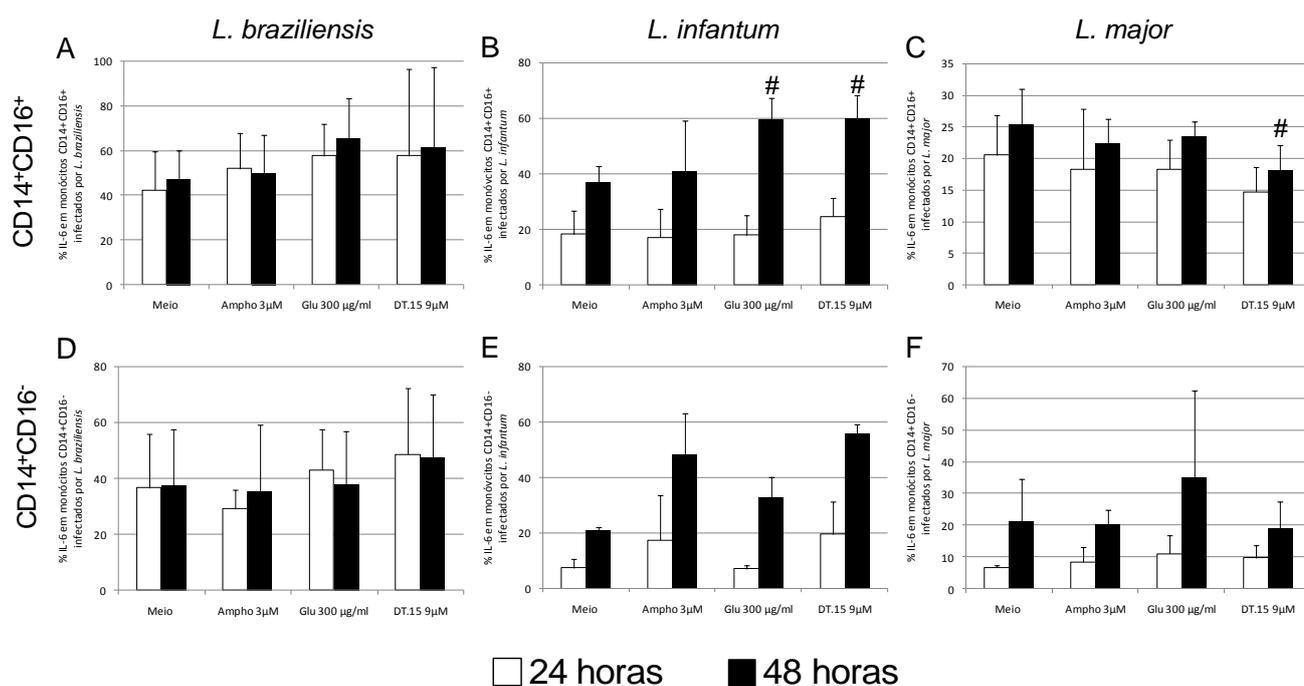


Figura 45: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), TD.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-6 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Para a citocina IL-12, não se encontraram diferenças na expressão dessa citocina nos monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ infectados *in vitro* por *L. braziliensis* e *L. infantum* após os tratamentos com as drogas (Figura 46 – A, B e D, E). Nas células CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L. major*, observou-se um aumento na expressão de IL-12 após o tratamento com anfotericina B em relação ao meio (Figura 46 – C).

É importante salientar que os monócitos não são as principais células produtoras de IL-12. As células dendríticas e macrófagos são as principais produtoras.

Quando se avaliou a produção dessa citocinas nos monócitos infectados *in vitro* e submetidos aos tratamentos com uma concentração 3 vezes maior de droga, não se encontraram diferenças entre os tratamentos nas células infectadas pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 47).

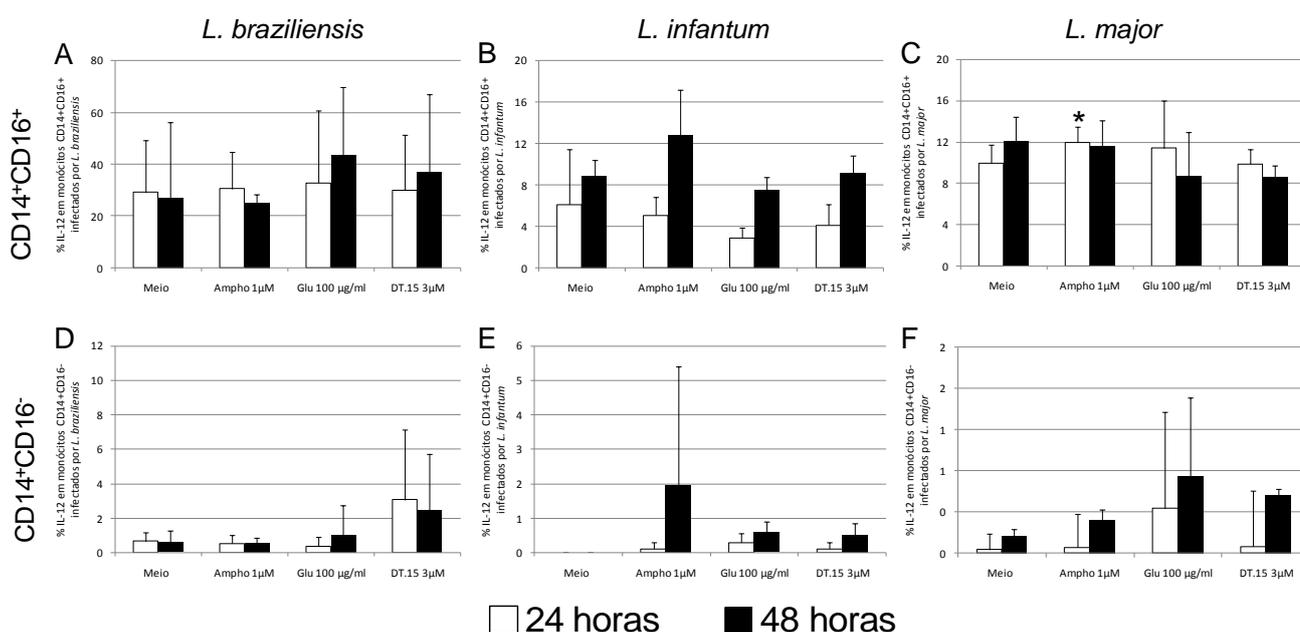


Figura 46: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-12 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

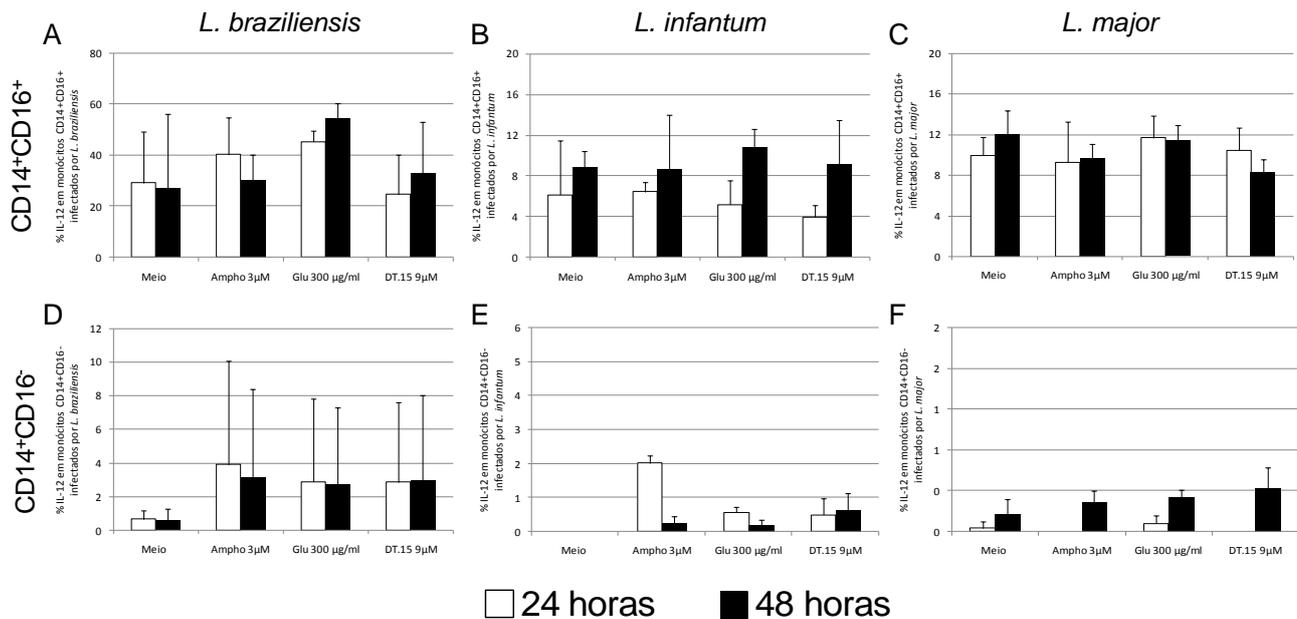


Figura 47: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), DT.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-12 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo.

A citocina IL-10 possui um importante papel imunomodulador. No entanto, não se encontraram diferenças na expressão entre os subtipos celulares CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ após diferentes tratamentos (Ampho., Glu. e DT.15) em relação ao meio nas células infectadas *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 47 e 48). Descrevendo os dados, também não se observaram diferenças na expressão de IL-10 nas células infectadas *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania*, como foi observado para outros marcadores. Dessa forma, pode-se sugerir que houve uma produção homogênea dessa citocina entre as diferentes espécies estudadas, e entre os tratamentos, tempo e concentrações de drogas (Figura 47 e 48).

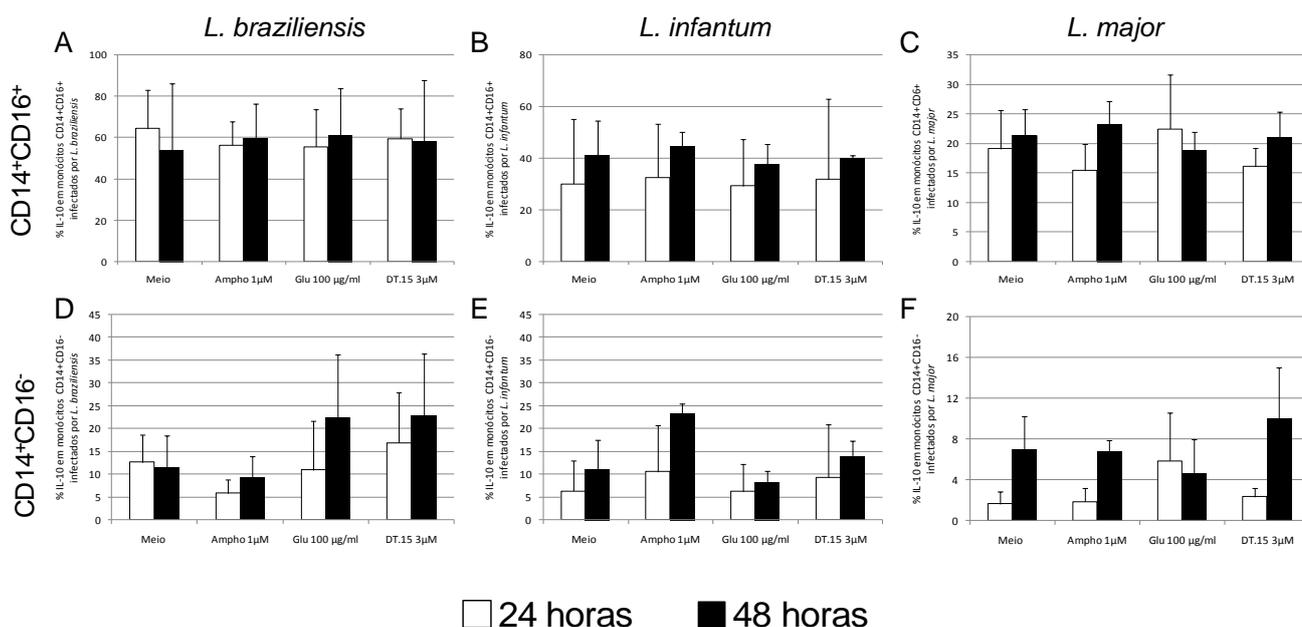


Figura 48: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM), Glucantime® (100µg/ml) e DT.15 (3µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM), Glu. (100 µg/ml), DT.15 (3 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-10 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

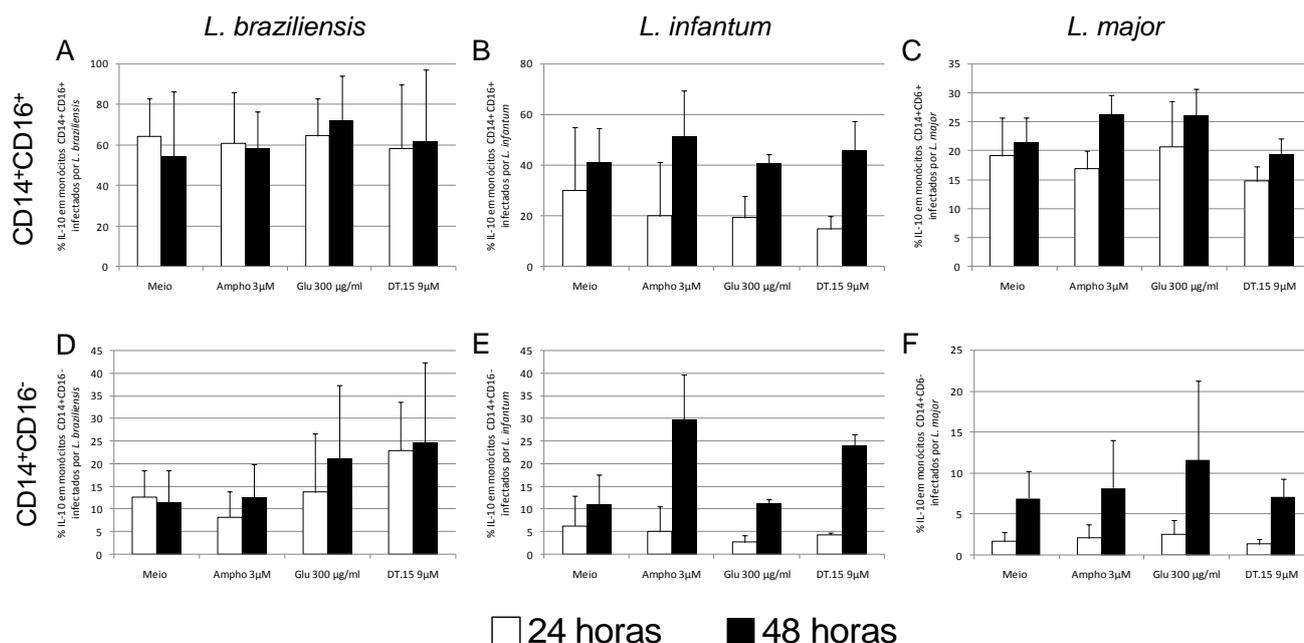


Figura 49: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM), Glucantime® (300µg/ml) e DT.15 (9µM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM), Glu. (300 µg/ml), DT.15 (9 µM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-10 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo.

Com o intuito de reunir os achados encontrados nessa etapa, construíram-se tabelas sumarizando os resultados obtidos na avaliação imunofenotípica dos marcadores de ativação e produção de citocinas (Tabela 5 e 6).

Dessa forma, na primeira etapa da parte 2 finalizaram-se os testes realizados com a naftoquinona teste nº 15 (DT.15). Em seguida, na parte 2-B, avaliou-se a atividade leishmanicida da NAC em comparação as drogas de tratamento padrão anfotericina B e Glucantime®.

Tabela 5: Sumário de resultados da expressão de moléculas co-estimuladoras após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

%	[] Droga	Subtipo de monócito	<i>Leishmania braziliensis</i>						<i>Leishmania infantum</i>						<i>Leishmania major</i>					
			Ampho. B		Glu.		DT.15		Ampho. B		Glu.		DT.15		Ampho. B		Glu.		DT.15	
			24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
CD11b	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	↓
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-
CD80	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	-	-	-	↑	-	-	-	↓
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	↓	↑	↓	-	↓	-	-	-	↑	-	-	↓
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD86	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	↑	-	↓	-	-	-	↑	↑	-	↓	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	↓	-	↑	↑	↓	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-
HLA-DR	[] A		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	[] B		-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1µM) e DT.15 (3µM).

[] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3µM) e DT.15 (9µM).

- = SEM alterações na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

↓ = REDUÇÃO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

↑ = AUMENTO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

Tabela 6: Sumário de resultados da expressão de moléculas citocinas após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B, Glucantime® e DT.15 em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

%	[] Droga	Subtipo de monócito	<i>Leishmania braziliensis</i>						<i>Leishmania infantum</i>						<i>Leishmania major</i>					
			Ampho. B		Glu.		DT.15		Ampho. B		Glu.		DT.15		Ampho. B		Glu.		DT.15	
			24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
TNF	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-6	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	↓
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-12	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1µM) e DT.15 (3µM).

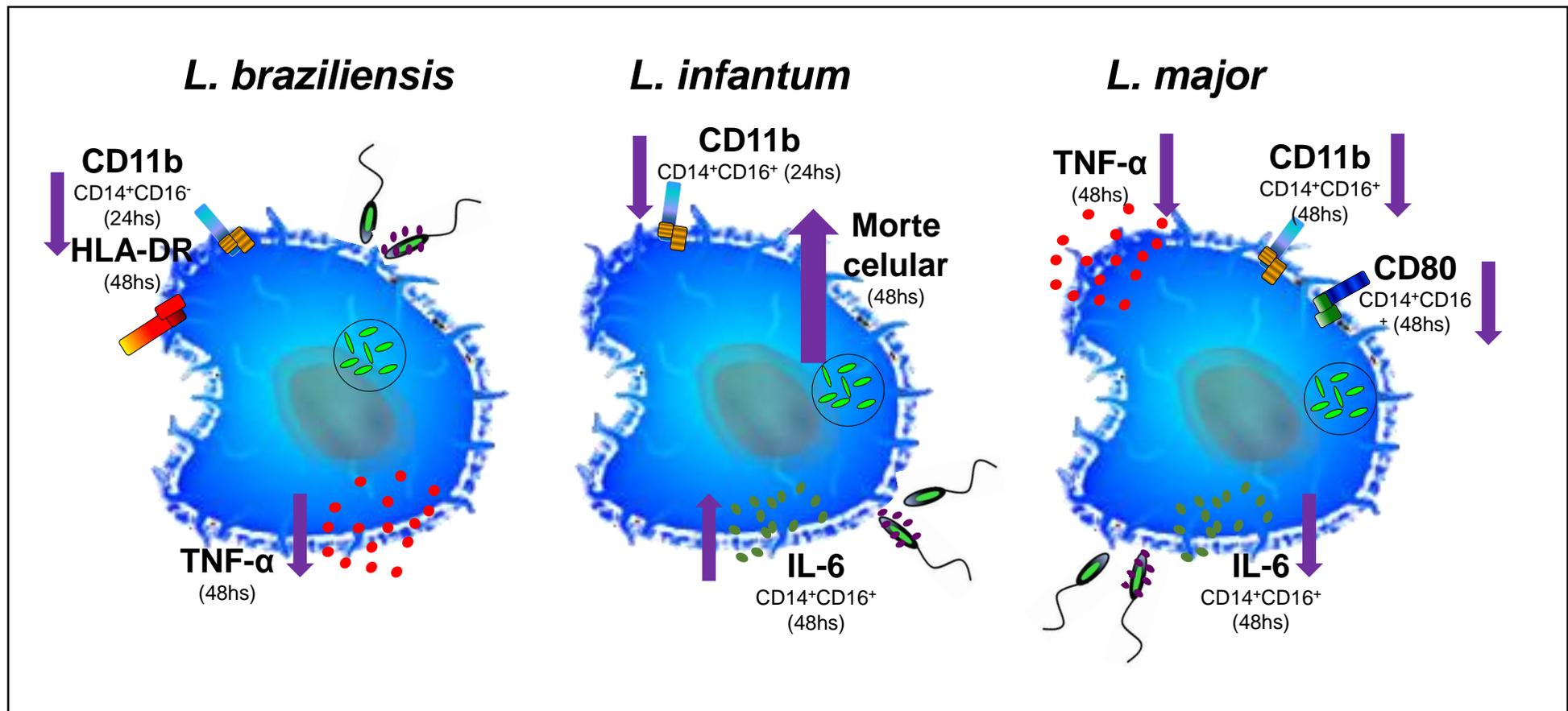
[] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3µM) e DT.15 (9µM).

- = SEM alterações na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

↓ = REDUÇÃO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

↑ = AUMENTO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

Sumário ilustrando os resultados obtidos do tratamento com DT.15 em CMSP infectadas pelas diferentes espécies de *Leishmania*.



5.2.2 – Parte 2-B - Avaliação do Efeito Leishmanicida da N-Acetilcisteína

5.2.2.1 – Avaliação do Efeito Leishmanicida das Drogas Glucantime® e NAC em Culturas de *L. braziliensis* e *L. major*

Tendo em vista a importância terapêutica da NAC, avaliou-se a ação desse composto e da droga padrão Glucantime® em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*, como demonstrado na figura 50.

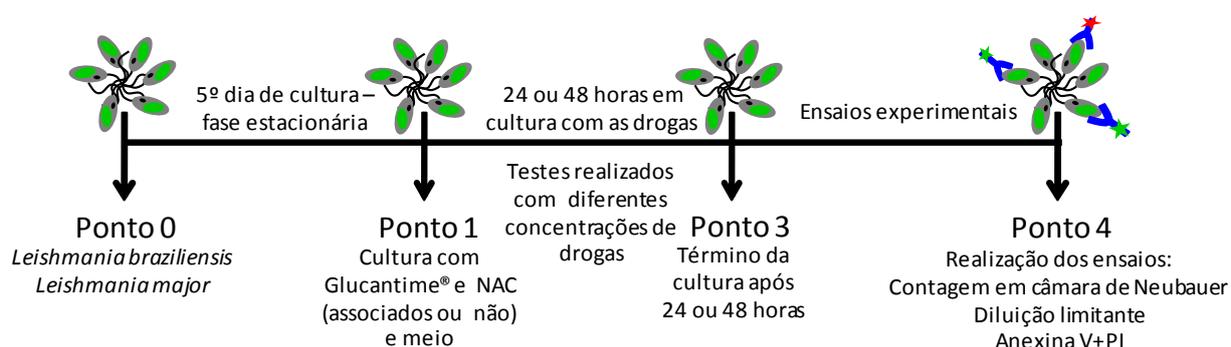


Figura 50: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos leishmanicidas das drogas Glucantime® e N-acetilcisteína (NAC) em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*.

Desta forma, as promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura por 24 ou 48 horas com diferentes concentrações de Glucantime® e NAC, associados ou não. O primeiro ensaio realizado foi a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer (Figura 51).

Com exceção do tratamento com Glucantime® 300 µg/ml por 24 horas, todos os tratamentos apresentaram redução na contagem de *Leishmania* em relação ao meio, nas duas concentrações e nos dois tempos de cultura (Figura 51). Encontrou-se uma diferença ainda maior nos tratamentos com as diferentes concentrações da NAC em relação à condição meio (Figura 51 – C e D).

Tais resultados sugerem que a NAC pode apresentar ação leishmanicida, no entanto, o mecanismo de ação dessa substância ainda é desconhecido.

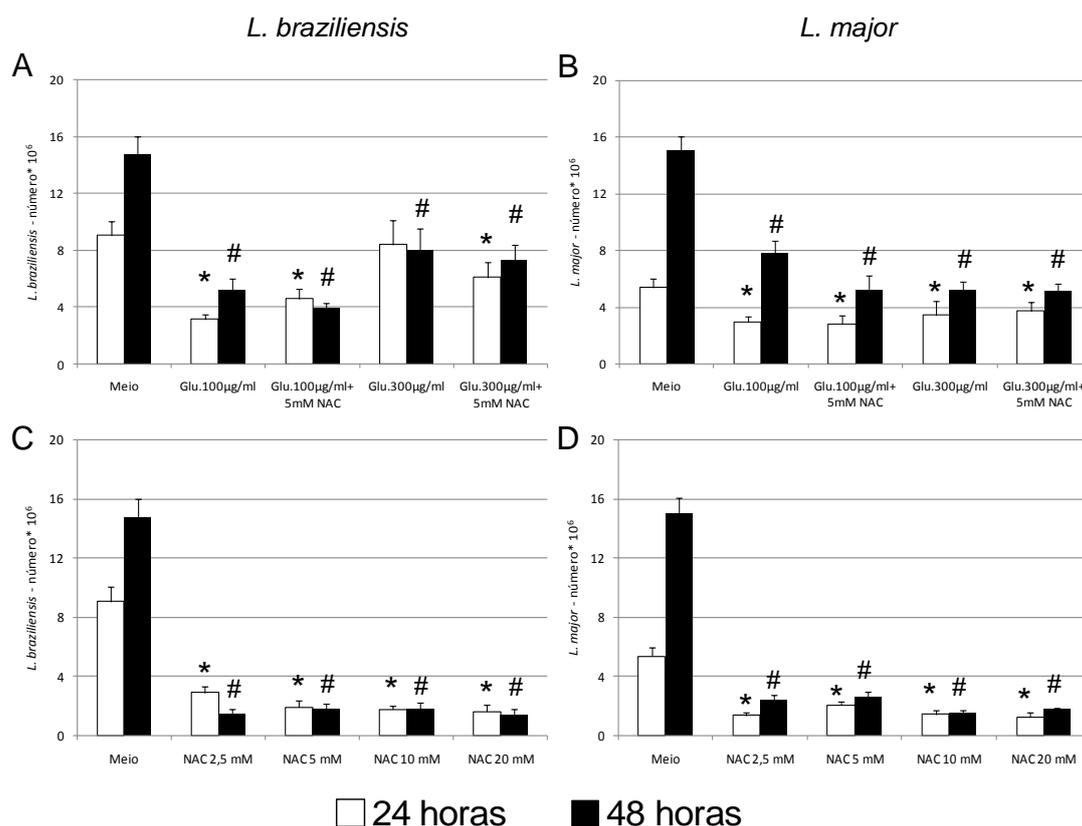


Figura 51: Glucantime® e NAC apresentam atividade leishmanicida após 24 ou 48 horas de tratamento em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*.

As espécies de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura na presença ou ausência de Glucantime® (Glu) em duas diferentes concentrações (100 e 300µg/ml), associada ou não a N-acetilcisteína (NAC) (5mM). Diferentes concentrações da NAC também foram testadas isoladamente (2,5; 5; 10 e 20 mM). Após 24 ou 48 horas de cultura, as células foram fixadas em solução de PBS/formaldeído 4% e contadas em câmara de Neubauer. (A e C) representa o número de *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, obtido utilizando Glucantime® nas duas concentrações, associado ou não a NAC. (B e D) representa o número de *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, obtido utilizando 4 diferentes concentrações da NAC. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativo de 3 experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Realizou-se também o ensaio de diluição limitante e resultados semelhantes ao ensaio de contagem em câmara de Neubauer foram encontrados (Figura 52). Assim, todos os tratamentos apresentaram redução na quantidade de *Leishmania*, principalmente, após o tratamento com diferentes concentrações da NAC (Figura - 52 C e D).

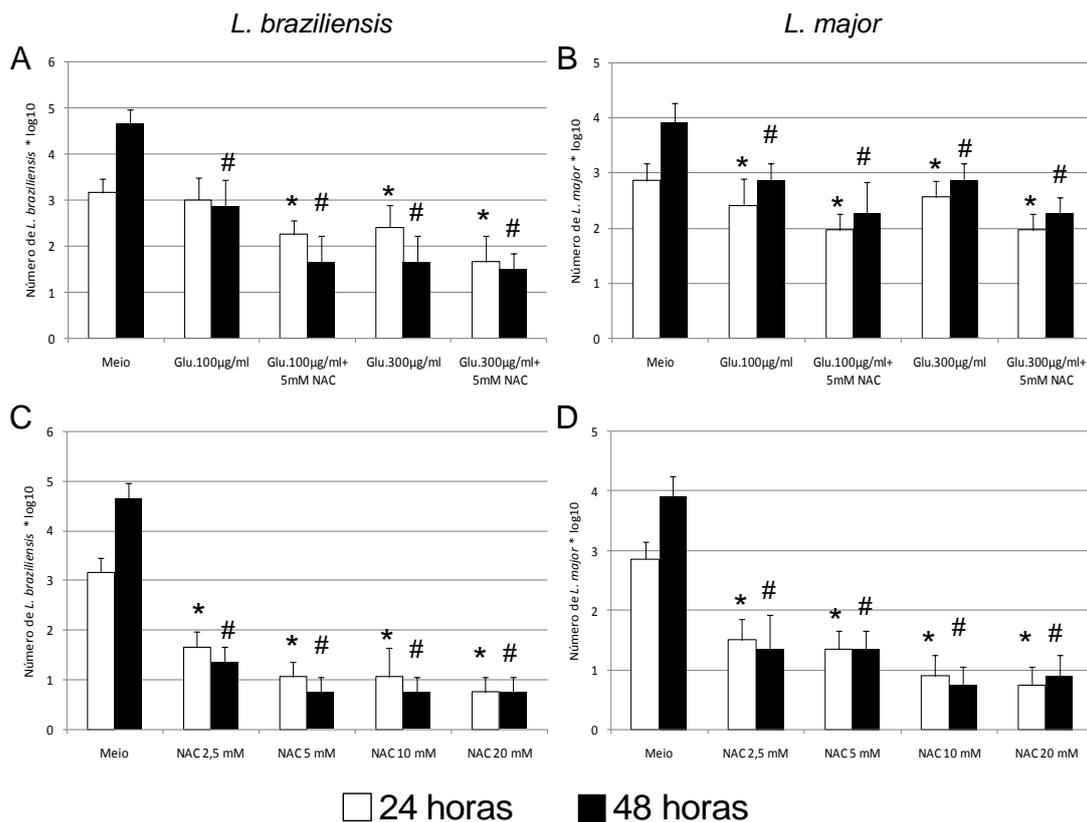


Figura 52: Glucantime® e NAC apresentam atividade leishmanicida após 24 ou 48 horas de tratamento em culturas de *L. braziliensis* e *L. major* por diluição limitante.

As espécies de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura na presença ou ausência de Glucantime® (Glu) em duas diferentes concentrações (100 e 300µg/ml), associada ou não a N-acetilcisteína (NAC) (5mM). Diferentes concentrações da NAC também foram testadas isoladamente (2,5; 5; 10 e 20 mM). Após 24 ou 48 horas, as células foram lavadas e colocas em cultura em meio Schneider's completo por mais 5 dias. Após esse período, foi feito a avaliação do crescimento celular em microscópio invertido. (A e C) representa o número de *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, obtido utilizando Glucantime® nas duas concentrações, associado ou não a NAC. (B e D) representa o número de *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, obtido utilizando 4 diferentes concentrações da NAC. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativo de 3 experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Até esse ponto, observou-se que o nas culturas com o Glucantime® associado ou não a NAC houve um menor no número de parasitos em relação ao controle, tanto por contagem em câmara de Neubauer, quanto por diluição limitante. No entanto, o tratamento isolado com NAC também promoveu uma redução no número de parasitos, e de forma mais expressiva que o tratamento convencional. Os ensaios realizados até o momento, não permitem sugerir se a NAC induziu a morte do parasito ou se inibe a sua proliferação. Para tal, realizou-se o ensaio de anexina V e PI nessas culturas.

Na figura 53, visualizam-se os gráficos de pontos ilustrativos que demonstram a expressão de anexina V e PI em *L. major* tratadas com Glucantime®, associado ou não a

NAC (5mM). Como se pode observar, não houve aumento desses marcadores quando NAC está associada a droga de tratamento padrão (Figura 53).

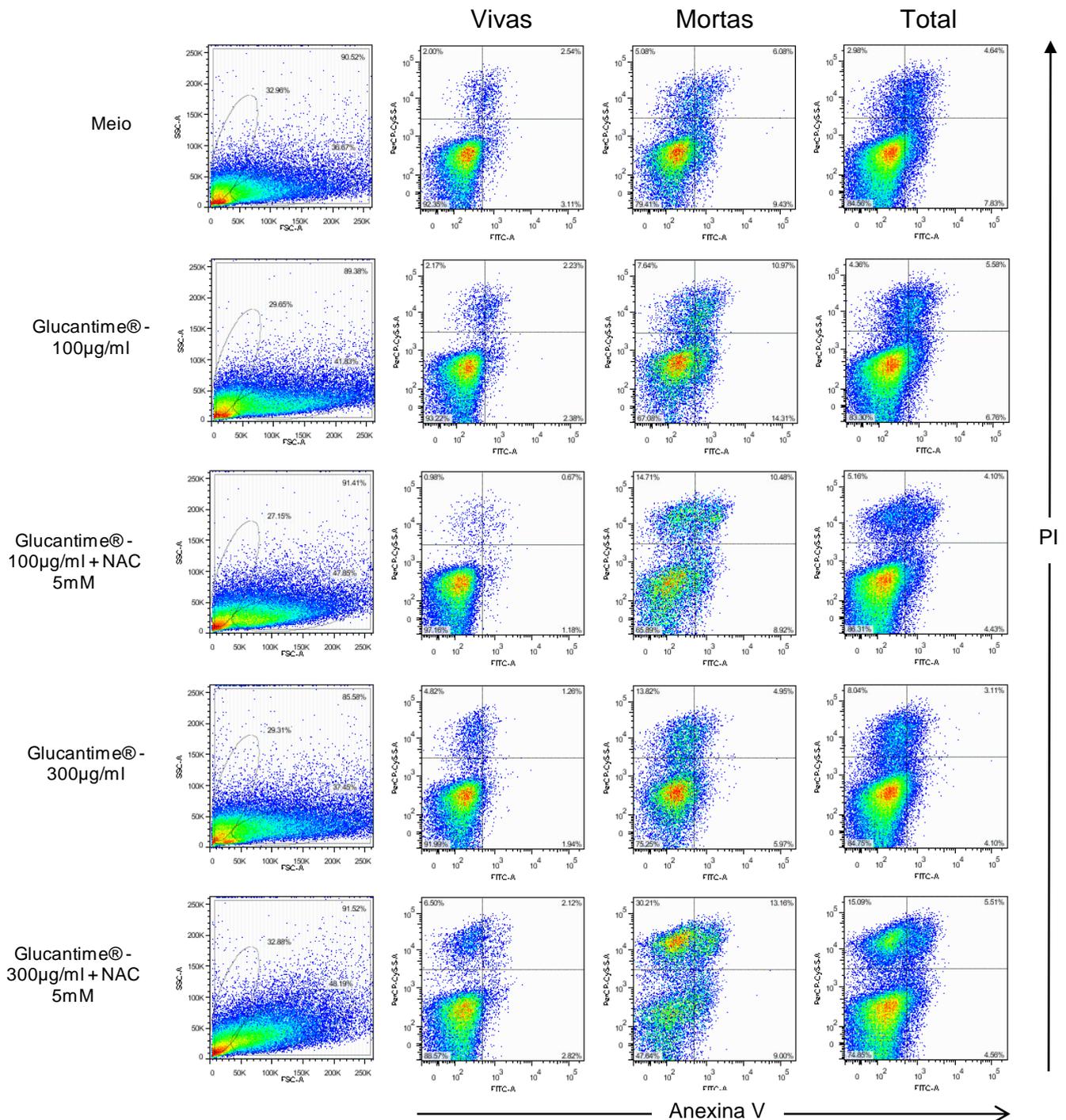


Figura 53: Avaliação da morte celular e apoptose após 24 horas de tratamento com Glucantime®, associado ou não a NAC, em culturas de *L. major*.

Após 24 horas de cultura com Glucantime® (100 e 300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM) ou meio (controle negativo), promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de FSCxSSC foram construídos para seleção das diferentes populações de *L. major* (vivas, mortas e total). Após a seleção, a expressão de anexina V e PI foi determinada pelo posicionamento dos quadrantes em gráficos de pontos de fluorescência 1 (FL1- FITC) versus fluorescência 3 (FL3 – PercP-Cy5.5).

A figura anterior ilustrou o perfil de marcação para anexina V + PI encontrado após o tratamento em apenas um tipo de *Leishmania* e em um determinado tempo de cultura. No entanto, gráficos de barra foram construídos para apresentar os resultados obtidos nos quatro experimentos, nas duas espécies de *Leishmania* e nos dois tempos de cultura (Figura 54).

De forma bastante interessante, observou-se na figura 54 – A que o tratamento associado de Glucantime® e NAC mantiveram o percentual da taxa de morte semelhante ao controle negativo (Meio) nas culturas de *L. braziliensis* (Figura 54 - A). Nas culturas de *L. major* não houve diferenças entre os tratamentos com relação ao meio (Figura 54 – B).

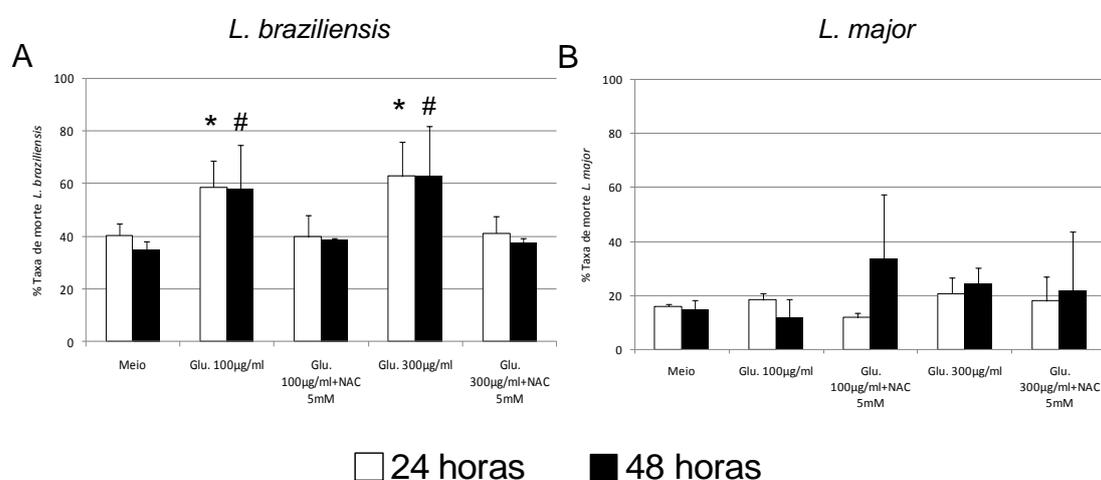


Figura 54: Tratamento com Glucantime® associado a NAC não induziu à morte celular e apoptose em culturas de *L. braziliensis* e *L. major* após 24 ou 48 horas.

As espécies de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura na presença ou ausência de Glucantime® (Glu) em duas diferentes concentrações (100 e 300µg/ml), associada ou não a N-acetilcisteína (NAC) (5mM). Após 24 ou 48 horas, as promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI). Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte foi obtido pelo somatório dos quadrantes Q1, Q2 e Q3. (A e B) representam a taxa de morte encontrada em *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, obtida utilizando Glucantime® nas duas concentrações, associada ou não a NAC. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, representativo de 3 experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

O perfil celular da *L. major* tratada com NAC em diferentes concentrações também foi avaliado, e observou-se que a presença desse composto nas culturas induziu a morte quando comparado com a condição meio (Figura 55). A indução de morte foi mais evidente do que a observada na figura 53, em que a cultura foi tratada com Glucantime®.

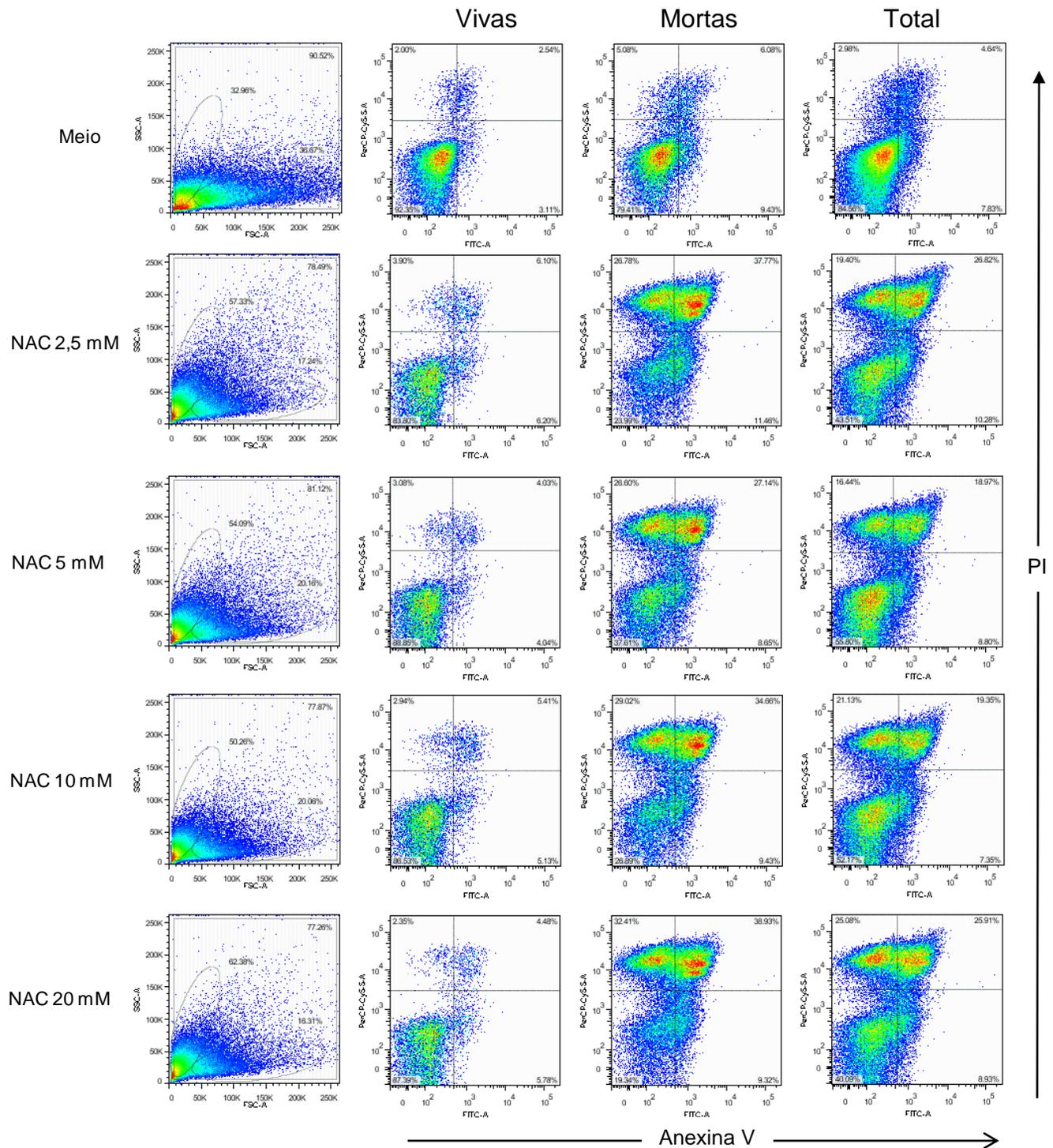


Figura 55: Avaliação da morte celular e apoptose após 24 horas de tratamento com N-acetilcisteína em culturas de *L. major*.

Após 24 horas de cultura com NAC (2,5; 5; 10 e 20mM) ou meio (controle negativo), promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas no citômetro de fluxo. Gráficos de pontos de FSCxSSC foram construídos para seleção das diferentes populações de *L. major* (vivas, mortas e total). Após a seleção, a expressão de anexina V e PI foi determinada pelo posicionamento dos quadrantes em gráficos de pontos de fluorescência 1 (FL1- FITC) versus fluorescência 3 (FL3 – PercP-Cy5.5).

Gráficos de barra também foram construídos demonstrando a taxa de morte das duas espécies de *Leishmania* nos 4 experimentos independentes realizados. Notou-se que as duas espécies de *Leishmania* apresentaram altas taxas de morte durante o tratamento, tanto no tempo de 24 horas, quanto em 48 horas em relação ao controle negativo (Figura 56).

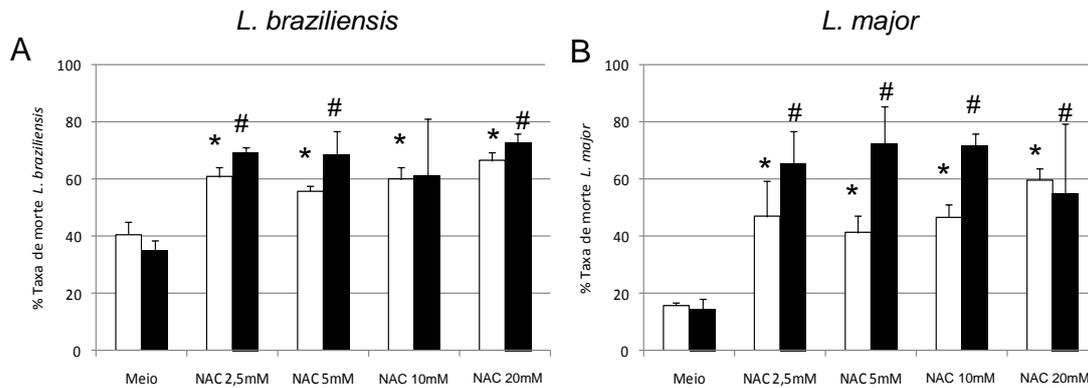


Figura 56: Tratamento com NAC induziu à morte celular e apoptose em culturas de *L. braziliensis* e *L. major* após 24 ou 48 horas.

As espécies de *L. braziliensis* e *L. major* foram mantidas em cultura na presença de diferentes concentrações de NAC (2,5; 5; 10 e 20 mM). Após 24 ou 48 horas, as promastigotas de *Leishmania* foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI). Os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte foi obtido pelo somatório dos quadrantes Q1, Q2 e Q3. (A e B) representam a taxa de morte encontrada em *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, obtido utilizando 4 diferentes concentrações de NAC. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em médias e desvio padrão, representativos de 3 experimentos independentes. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

É interessante ressaltar como o tratamento com NAC de forma isolada levou a morte do parasito. No entanto, o mecanismo de ação leishmanicida desse composto continua desconhecido, sendo necessário mais experimentos com técnicas distintas para responder a essa questão.

Os resultados encontrados foram compilados em duas tabelas, em que se demonstraram os efeitos leishmanicidas do Glucantime®, associado ou não a NAC, bem como das diferentes concentrações da NAC nessas duas espécies de *Leishmania* (Tabela 7 e 8).

Tabela 7: Sumário de resultados do efeito leishmanicida da droga Glucantime®, associado ou não a NAC, em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*

Técnica Experimental	[] Glu.	<i>Leishmania braziliensis</i>				<i>Leishmania major</i>			
		Glu.		Glu.+NAC		Glu.		Glu.+NAC	
		24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs
Contagem em câmara de Neubauer	100µg/ml	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
	300µg/ml	-	++	++	+++	++	+++	++	+++
Diluição Limitante	100µg/ml	-	++	++	+++	+	++	++	++
	300µg/ml	++	+++	+++	+++	+	++	++	++
Marcação por Anexina V e PI	100µg/ml	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	300µg/ml	+++	+++	-	-	-	-	-	-

- = NENHUMA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.
 + = BAIXA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.
 ++ = MÉDIA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.
 +++ = ALTA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.

Tabela 8: Sumário de resultados do efeito leishmanicida das diferentes concentrações da NAC em culturas de *L. braziliensis* e *L. major*

Técnica Experimental	Tempo horas	<i>Leishmania braziliensis</i>				<i>Leishmania major</i>			
		Concentração NAC				Concentração NAC			
		2,5mM	5mM	10mM	20mM	2,5mM	5mM	10mM	20mM
Contagem em câmara de Neubauer	24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Diluição Limitante	24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Marcação por Anexina V e PI	24	++	++	++	++	++	++	++	+++
	48	++	++	-	++	+++	+++	+++	+++

- = NENHUMA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.
 + = BAIXA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.
 ++ = MÉDIA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.
 +++ = ALTA atividade leishmanicida em relação ao controle negativo Meio.

Após avaliar o efeito da NAC associado ou não à droga Glucantime® em culturas de *Leishmania*, caracterizou-se a morte e expressão de marcadores celulares em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis. Essas células foram infectadas *in vitro* por 3 diferentes espécies de *Leishmania*, e tratadas com anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC.

5.2.2.2 – Efeito das Drogas Anfotericina B e Glucantime®, Associado ou não a NAC, em Monócitos de CMSP de Indivíduos Saudáveis Após Infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

Para avaliar a ação da NAC em monócitos infectados por 3 espécies de *Leishmania*, utilizou-se a concentração de 5mM, associada ou não às drogas de tratamento padrão (anfotericina B e Glucantime®). Essa escolha foi baseada nos estudos prévios obtidos pelo nosso grupo (Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003), e também pelos resultados presentes nessa tese. O delineamento experimental utilizado está demonstrado na figura 57.

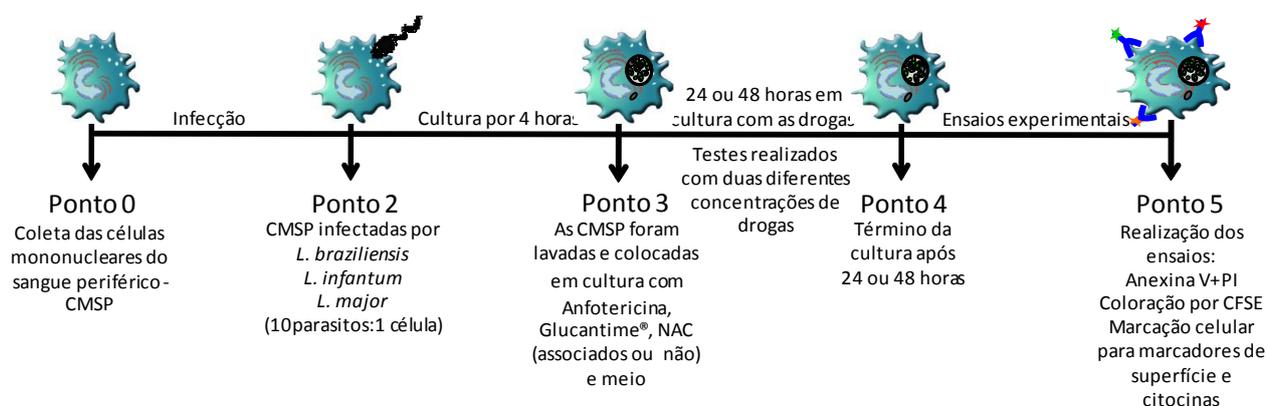


Figura 57: Delineamento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos das drogas anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC, em culturas de CMSP infectadas por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

O primeiro ensaio realizado foi a marcação de anexina V e PI para avaliação dos processos de morte das células infectadas *in vitro* pelas espécies de *Leishmania*. Como se pode observar na condição de cultura meio, as células que não foram infectadas (Figura 58 – A) apresentaram baixa frequência de marcação para anexina V e PI em relação as células que foram infectadas (Figura 58 – B, C e D). Ainda analisando os monócitos não infectados, notou-se que o tratamento com Glucantime®, em ambos os tempos de cultura, induziram uma alta taxa de morte nos monócitos. Resultado semelhante foi observado com anfotericina B, mas apenas no tempo de 48 horas (Figura 58 – A). A presença da NAC associada ao tratamento, não induziu uma resposta protetora nessa situação (Figura 58 – A).

Nos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis e infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, observou-se que o tratamento conjunto de Glucantime®+NAC, nos tempos de 24 e 48 horas, induziram uma maior taxa de morte quando comparado a condição meio (Figura 58 – B). O tratamento conjunto de anfotericina B+NAC, no tempo

de 48 horas, induziu, no entanto, uma redução da taxa de morte nessas mesmas células (Figura 58 – B).

Nas células infectadas por *L. infantum* notou-se que após o tratamento com anfotericina B, na presença ou ausência de NAC, houve aumento na taxa de morte em relação ao controle em ambos os tempos de cultura (Figura 58 – C). O tratamento com Glucantime® também induziu um pequeno aumento, mas apenas no tempo de 24 horas (Figura 58 – C). Nas células infectadas *in vitro* por *L. major*, houve aumento na taxa de morte na presença de NAC isoladamente (Meio + NAC) em ambos tempos de cultura (Figura 58 – D). Esse resultado não foi observado em nenhuma das células infectadas pelas outras espécies de *Leishmania*. Ainda analisando as células infectadas por *L. major*, encontrou-se aumento na taxa de morte nas células tratadas com Glucantime®, principalmente quando associado a NAC (Figura 58 – D).

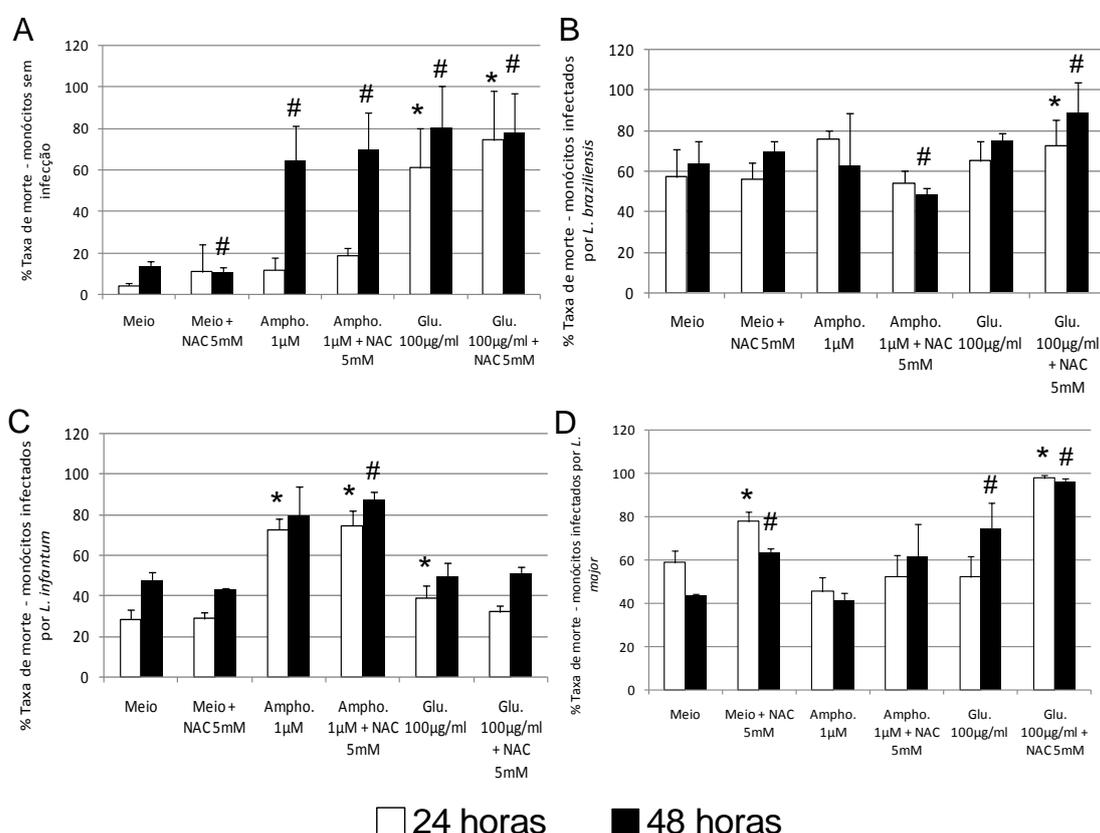


Figura 58: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em culturas de CMSP infectadas *in vitro* ou não com as espécies de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* ou não com 3 diferentes espécies de *Leishmania* e marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI). Após 24 ou 48 horas de cultura com meio (controle negativo) Ampho B (1µM), Glu. (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM), os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte, em %, foi obtido pelo somatório de Q1, Q2 e Q3, como descrito na metodologia. (A) representa a taxa de morte dos monócitos não infectados. (B, C e D) representam a taxa de morte encontrada para os monócitos provenientes de CMSP infectadas por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*)

indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Também avaliou-se a morte celular nos monócitos tratados com uma concentração 3 vezes maior de droga, como se pode observar na figura 59. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na figura 58.

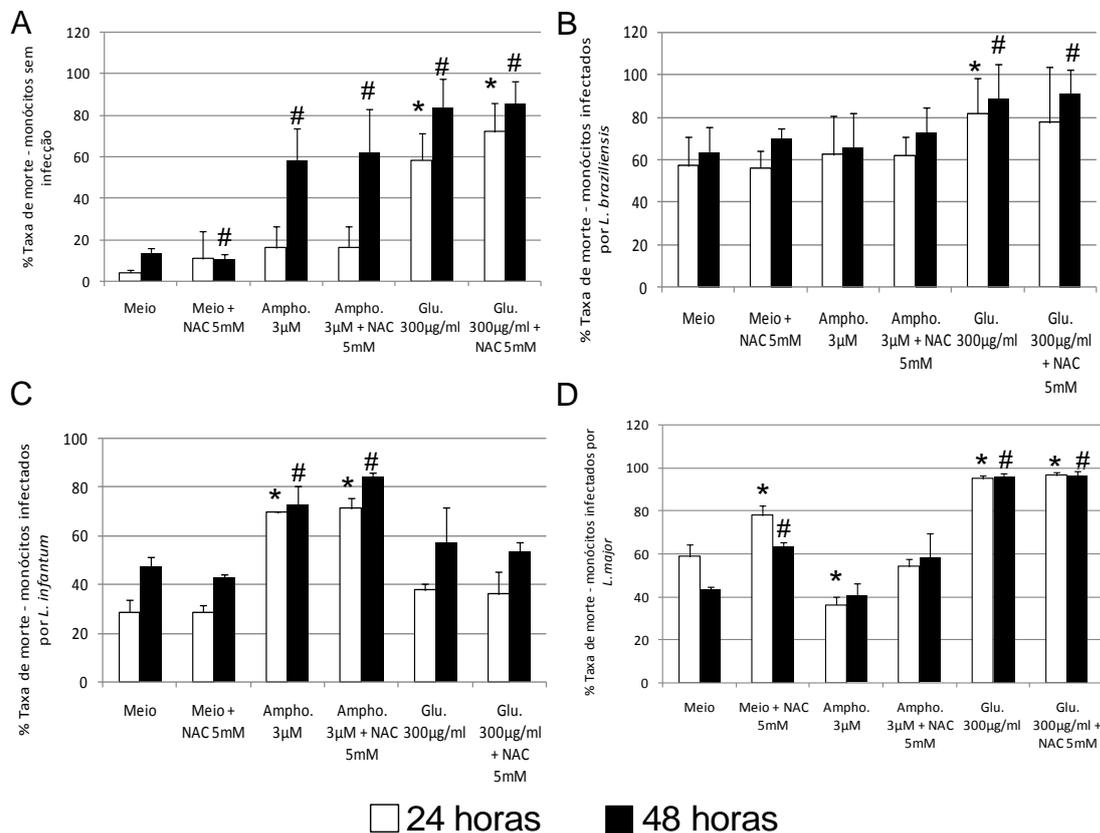


Figura 59: Taxa de morte e apoptose em monócitos após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em culturas de CMSP infectadas *in vitro* ou não com as espécies de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* ou não com 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com meio (controle negativo), Ampho B (3μM), Glu. (300μg/ml), associados ou não a NAC (5mM), as células foram marcadas para anexina V e iodeto de propídio (PI) e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. O valor da frequência de morte, em %, foi obtido pelo somatório de Q1, Q2 e Q3, como descrito na metodologia. (A) representa a taxa de morte dos monócitos não infectados. (B, C e D) representam a taxa de morte encontrada para os monócitos provenientes de CMSP infectadas por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com $n=3$ indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Experimentos para avaliar a infecção e morte do parasito pelo ensaio de CFSE também foram realizados. Como se nota na figura 60, não houve diferença na taxa de infecção dos monócitos infectados pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 60). Infelizmente, as amostras contendo as células infectadas *in vitro* por *L. infantum* e

tratadas com anfotericina B e Glucantime®, nas duas concentrações, foram perdidas (Figura 60 – B e E). Mais uma vez, não houve diferença na taxa de infecção nos monócitos submetidos aos diferentes tratamentos (Figura 60).

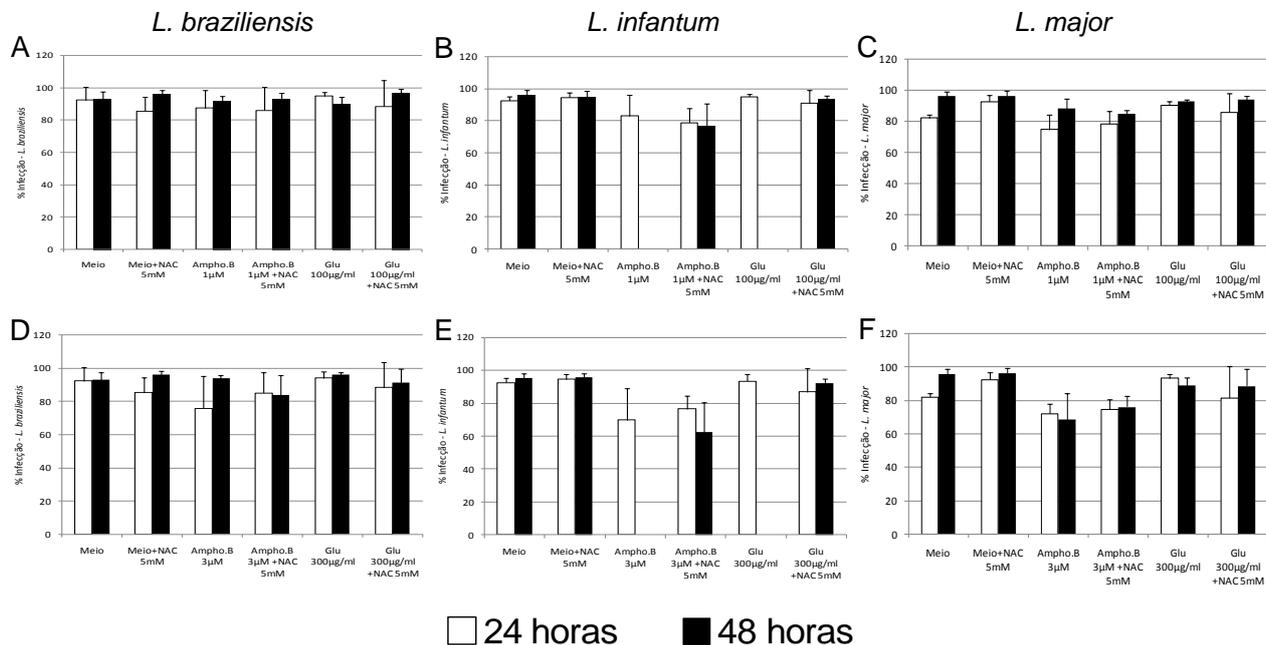


Figura 60: Infecção dos monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC.

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania* marcadas com CFSE. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3µM) e Glu. (100 e 300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam a taxa de infecção dos monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam a taxa de infecção dos monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam a taxa de infecção dos monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo.

Diferentemente do que se observou na taxa de infecção (Figura 60), ao avaliar a IMF do marcador CFSE nos monócitos das CMSP dos indivíduos saudáveis e infectadas *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* notou-se variações. Nas células infectadas por *L. braziliensis*, houve redução na IMF desse marcador quando a cultura foi realizada na presença de NAC 5mM (Figura 61 – A e D). Ainda avaliando essas células, o tratamento com anfotericina B, associado ou não com NAC, reduziu a IMF no tempo de 48 horas na concentração 3 vezes maior de droga (Figura 61 – D).

Infelizmente, as amostras anfotericina B e Glucantime® no tempo de 48 horas foram perdidas nas células infectadas por *L. infantum*, o que impossibilitou algumas comparações. No entanto, o tratamento com anfotericina B associado a NAC reduziu a IMF no tempo de 48 horas e na concentração de 3 µM, em relação ao controle negativo (condição meio) (Figura 61 – E).

Nos monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, observou-se que a presença da NAC isoladamente no meio de cultura aumentou a IMF na concentração de 5mM e no tempo de 24 horas em relação ao controle. Esse resultado também foi encontrado nas células tratadas apenas com Glucantime® em ambas as concentrações e no tempo de 24 horas (Figura 61 – C e F). Com relação ao tratamento com anfotericina B associado a NAC, notou-se uma redução na IMF nos monócitos tratados com 3 µM por 48 horas (Figura 61 – F). Mais uma vez, observaram-se que as células infectadas pelas diferentes espécies apresentam comportamento bastante distintos como visto na parte 2-A dessa tese.

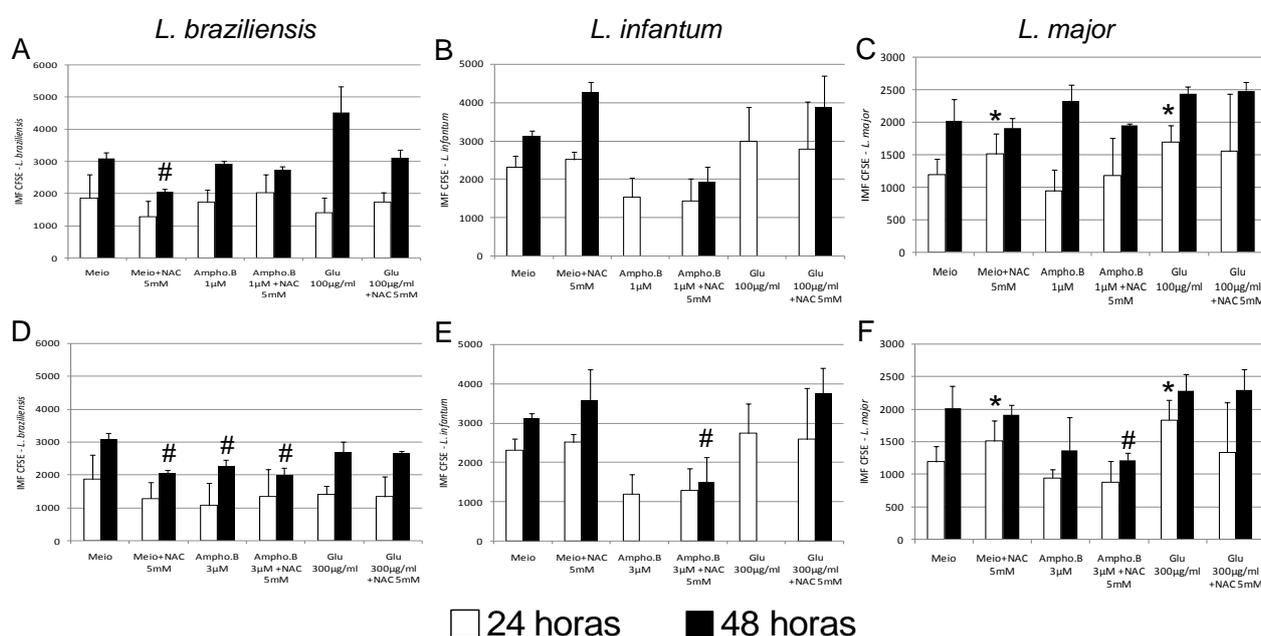


Figura 61: Intensidade média de fluorescência do CFSE em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* coradas por CFSE após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B e Glucantime®, associado ou não a NAC. CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania* marcadas com CFSE. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3µM) e Glu. (100 e 300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo), os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Após avaliar a expressão de anexina V e PI nos monócitos infectados pelas diferentes espécies de *Leishmania*, construiu-se uma tabela contendo o sumário dos resultados obtidos até esse momento (Tabela 9)

Tabela 9: Sumário dos resultados da morte celular e infecção após 24 e 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B e Glucantime®, associados ou

Técnica Experimental	[] Droga	<i>Leishmania braziliensis</i>								<i>Leishmania infantum</i>								<i>Leishmania major</i>							
		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC	
		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
Anexina V e PI	[] A	-	-	-	↓	-	-	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑
	[] B	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	↓	-	-	-	↑	↑	↑	↑
Coloração por CFSE	[] A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	§	-	-	-	§	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-
	[] B	-	↓	-	↓	-	-	-	-	-	§	-	↓	-	§	-	-	-	-	-	↓	↑	-	-	-

não a NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1µM), Glucantime (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).

[] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3µM), Glucantime (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).

- = SEM alterações na morte celular por anexina V+PI ou na IMF do marcador CFSE em relação ao controle negativo Meio.

↓ = REDUÇÃO na morte celular por anexina V+PI ou na IMF do marcador CFSE em relação ao controle negativo Meio.

↑ = AUMENTO na morte celular por anexina V+PI ou na IMF do marcador CFSE em relação ao controle negativo Meio.

§ = Amostra perdida

Dando continuidade a caracterização dessas células após os tratamentos com as drogas, realizou-se o ensaio de imunofenotipagem. Assim, como nas células tratadas com a droga teste DT.15, os marcadores avaliados foram CD11b, CD80, CD86 e HLA-DR, bem como as citocinas TNF, IL-6, IL-10, IL-12. Analisaram-se esses marcadores em monócitos do subtipo CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania*.

O primeiro marcador avaliado foi CD11b. Como se pode observar na figura 62, os monócitos CD14⁺CD16⁺ provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis e infectados *in vitro* por *L. braziliensis* não apresentaram diferenças na expressão de CD11b entre os diferentes tratamentos (Figura 62 – A). Já no subtipo CD14⁺CD16⁻, as células tratadas apenas com NAC sofreram redução na expressão de CD11b (Figura 62 – D). Nas células CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L. infantum* e tratadas com anfotericina B por 48 horas, houve um aumento na expressão de CD11b em relação ao meio (Figura 62 – B). Não se encontrou diferença na expressão desse marcador entre os tratamentos nos monócitos infectados por *L. major* (Figura 62 – C e F).

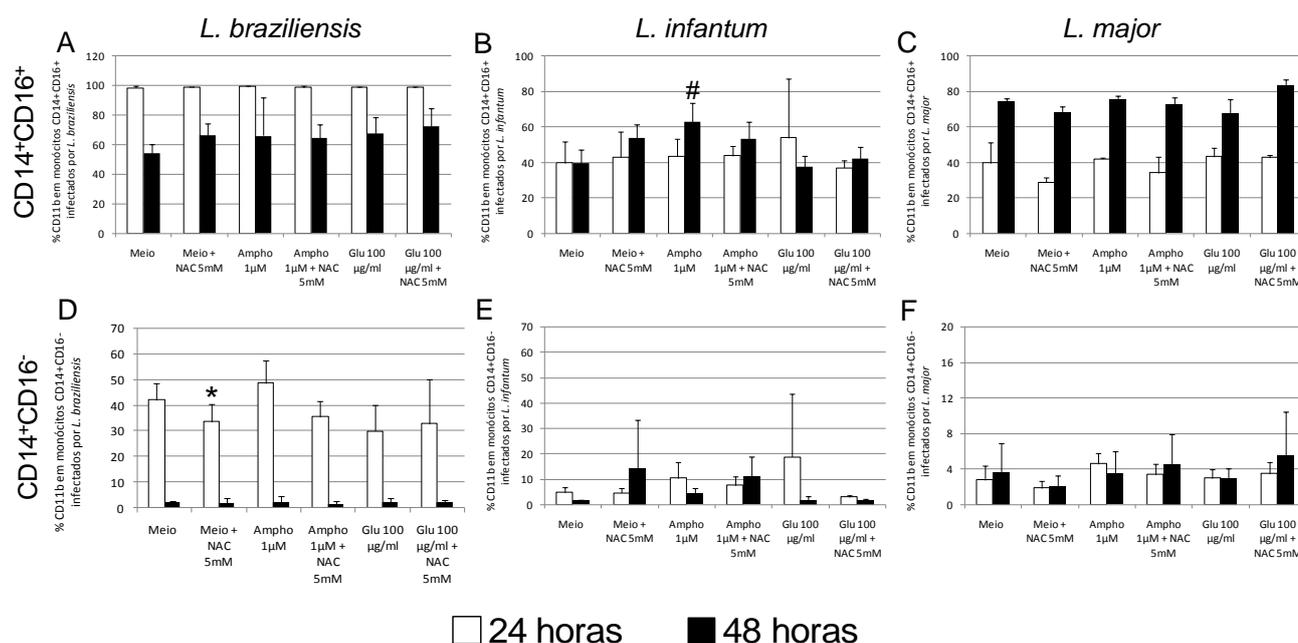


Figura 62: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM, e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD11b e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Ainda analisando-se a expressão de CD11b, resultados semelhantes na concentração 3 vezes maior de droga foram observados (Figura 63). Nos monócitos CD14⁺CD16⁻ infectados por *L. braziliensis*, encontraram-se resultados similares aos apresentados na figura 62. Já no subtipo de monócito CD14⁺CD16⁺, o tratamento com Glucantime® induziu aumento na expressão desse marcador após 48 horas de culturas nas células infectadas por *L. braziliensis* e *L. major* (Figura 63 A e C). Nos monócitos infectados por *L. infantum*, o resultado se manteve, com aumento na expressão desse receptor no subtipo CD14⁺CD16⁺ após tratamento com anfotericina B. Apesar das diferenças encontradas entre os grupos, mais uma, observa-se como as células comportam de forma distinta de acordo com a espécie infectante.

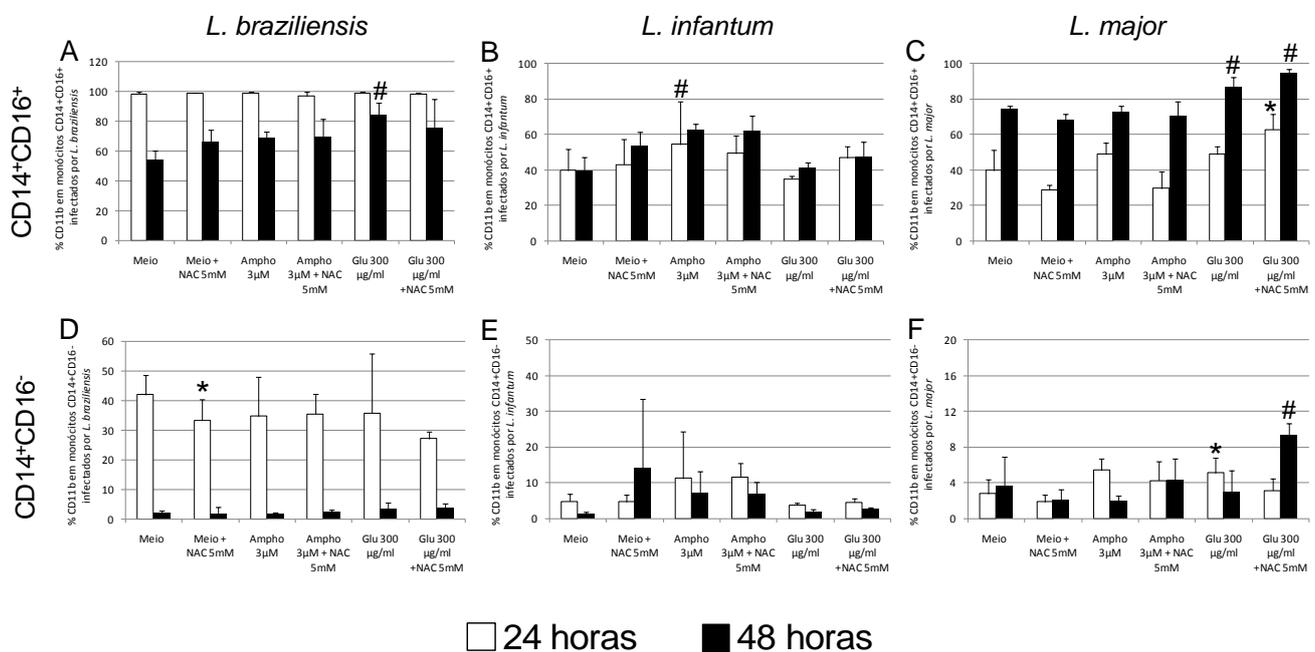


Figura 63: Expressão de CD11b em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD11b e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Quando se avaliou a expressão da molécula co-estimuladora CD80, não houve diferenças entre os tratamentos nas células infectadas *in vitro* por *L. braziliensis* nos dois subtipos de monócitos analisados (Figura 64 – A e D). Nas células infectadas *in vitro* por

L. infantum e tratadas com anfotericina B e Glucantime® por 24 horas, notou-se uma redução na expressão desse marcador, o que não ocorreu quando essas drogas estavam associadas a NAC (Figura 64 – B).

Nos subtipos CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ infectados por *L. major*, observou-se aumento na expressão desse marcador em ambos os tipos celulares nas células tratadas com Glucantime® associado a NAC (Figura 64 – C e F).

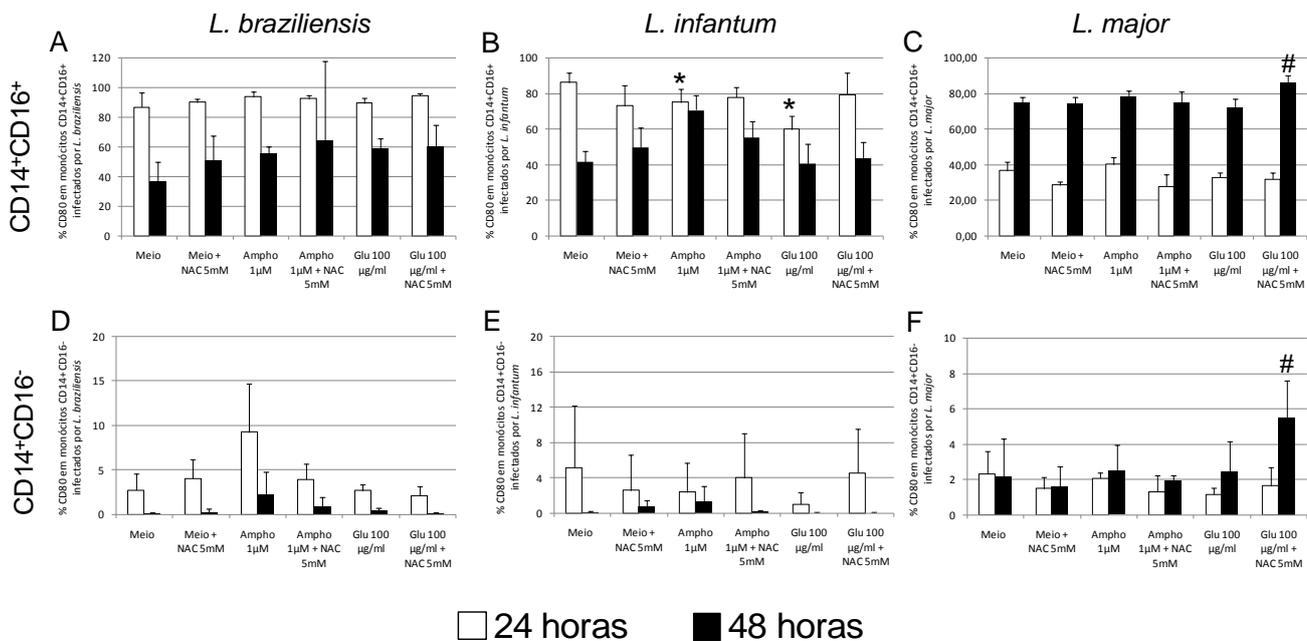


Figura 64: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associado ou não a NAC (5 mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD80 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Nos experimentos em que foi avaliada uma quantidade de droga 3 vezes maior, observaram-se resultados semelhantes aos encontrados na figura 64, porém, com algumas diferenças. Nos monócitos infectados por *L. braziliensis*, o tratamento com anfotericina B associado a NAC aumentou a expressão desse marcador no subtipo CD14⁺CD16⁺ após 48 horas de cultura (Figura 65 – A). Nas células infectadas por *L. infantum*, houve redução na expressão de CD80 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ tratados por 24 horas com anfotericina B ou Glucantime® (Figura 65 – B). No entanto, no tempo de 48

horas, o tratamento com anfotericina B aumentou a expressão desse marcador em relação ao controle negativo (Figura 65 – B).

Nos monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. major*, no tempo de 24 horas observou-se uma redução na expressão de CD80 em células tratadas apenas com NAC (Figura 65 –C). O contrário foi observado no tratamento com Glucantime® + NAC neste tempo, com aumento na expressão de CD80 (Figura 65- C). No subtipo de monócito CD14⁺CD16⁻, infectado pelas diferentes espécies de *Leishmania*, não foi observado alteração entre os tratamentos (Figura 65 – D a F).

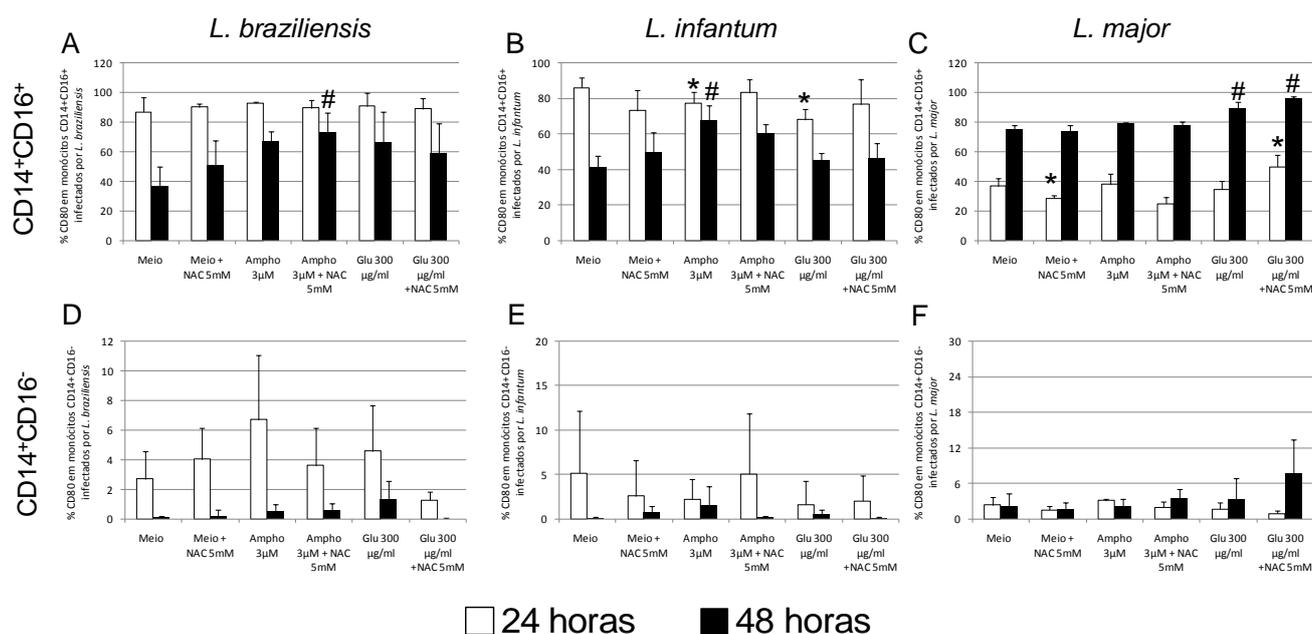


Figura 65: Expressão de CD80 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD80 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Outro marcador de ativação avaliado foi a molécula CD86. Como se demonstrou na figura 66, os monócitos CD14⁺CD16⁻ infectados por *L. braziliensis*, reduziram a expressão desse marcador no tempo de 24 horas após o tratamento com anfotericina B ou Glucantime®, o que não foi observado quando essas drogas estavam associadas a NAC (Figura 66 – D).

Nos monócitos infectados por *L. infantum*, no tempo de 24 horas de cultura, houve aumento na expressão de CD86 após tratamento com anfotericina B. Observou-se o contrário no tratamento com Glucantime® (Figura 66 –B). Nas células CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L. major*, houve aumento na expressão de CD86 após o tratamento com anfotericina B, em ambos os tempos de cultura. Essas mesmas células apresentaram redução na expressão desse marcador de ativação quando tratadas por 24 horas com NAC apenas (Figura 66 – C).

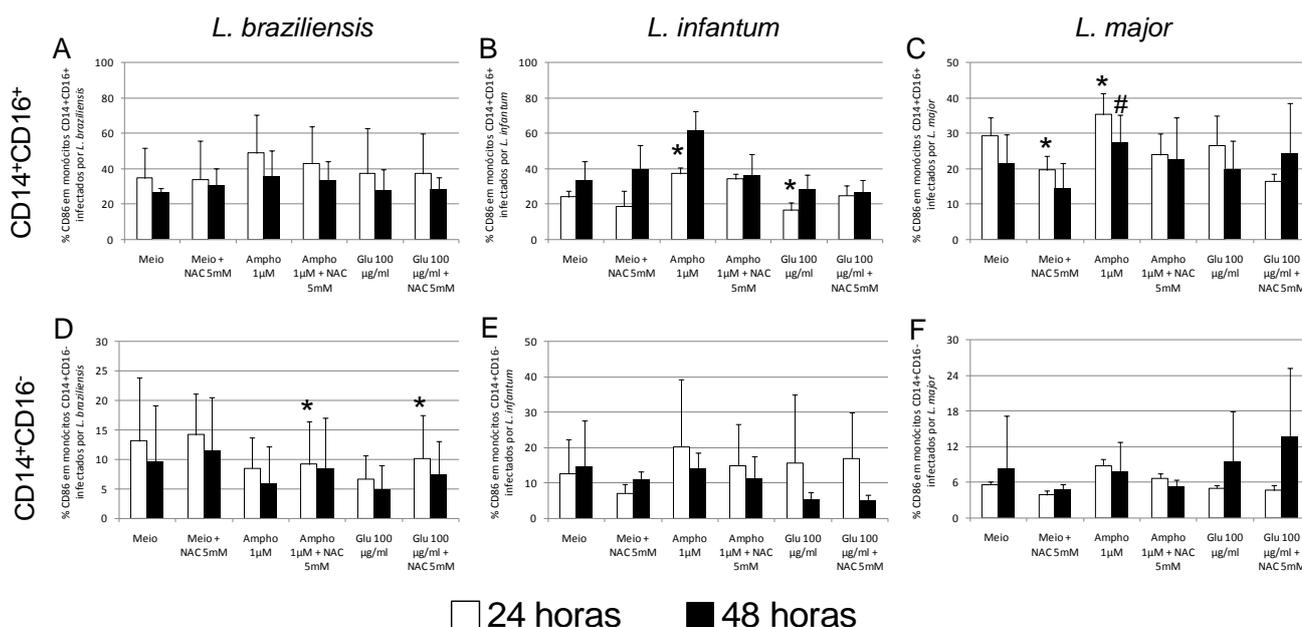


Figura 66: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associado ou não a NAC (5 mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD86 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Assim como nos experimentos anteriores, avaliou-se a expressão dos marcadores de ativação em uma concentração 3 vezes maior das drogas anfotericina B e Glucantime® (Figura 67).

Nos monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. braziliensis*, o tratamento com anfotericina B induziu um aumento na expressão de CD86 em relação a condição meio. No entanto, quando o subtipo CD14⁺CD16⁻ foi avaliado, observou-se que o tratamento

com NAC em conjunto com anfotericina B ou Glucantime®, nos tempos de cultura de 24 ou 48 horas, reduziu a expressão desse marcador de ativação (Figura 67 – A e D).

Na avaliação dos monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. infantum*, observou-se aumento na expressão de CD86 após o tratamento com anfotericina B no tempo de 24 e 48 horas. O tratamento com esta droga associado a NAC também induziu aumento, mas, apenas no tempo de 24 horas (Figura 67 – B).

Nos dois subtipos de monócitos infectados por *L. major*, o tratamento com NAC reduziu a expressão de CD86 no tempo de 24 horas (Figura 67 – C e F). Não se observou esse efeito no período de cultura de 48 horas. No entanto, o tratamento com anfotericina B aumentou a expressão de CD86 nos dois tempos de cultura no subtipo CD14⁺CD16⁺, e apenas no tempo de 24 horas no subtipo CD14⁺CD16⁻ (Figura 67 – C e F). De forma interessante, no subtipo CD14⁺CD16⁺ infectado *in vitro* por *L. major*, notou-se que o tratamento em conjunto de anfotericina B e NAC reduziu a expressão de CD86 no tempo de 24 horas (Figura 67 – C).

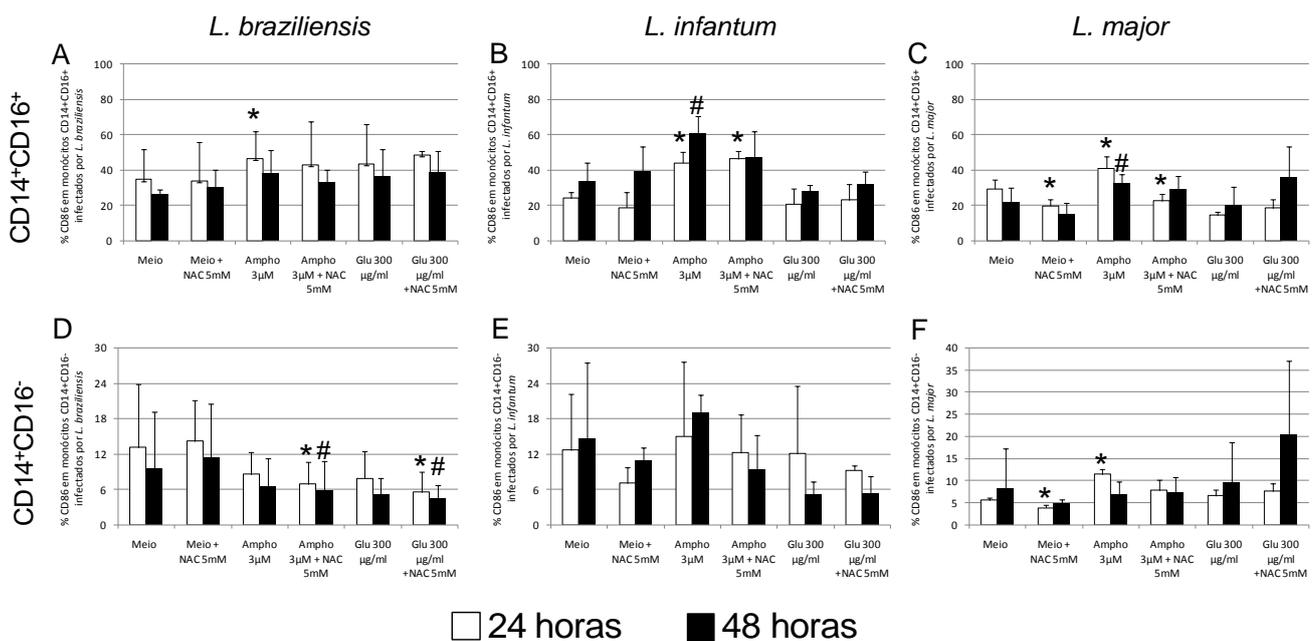


Figura 67: Expressão de CD86 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e CD86 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Para o marcador de ativação HLA-DR, analisou-se a intensidade média de fluorescência (IMF). Quando se realizaram as comparações dos tratamentos em relação a condição meio, observou-se que o tratamento com NAC reduziu a IMF desse marcador em monócitos infectados por *L. major* (Figura 68 – C e F). Não se encontraram diferenças entre os tratamentos nos monócitos infectados pelas outras espécies de *Leishmania* (Figura 68). No entanto, descrevendo os dados, pode-se observar como a IMF desse marcador variou de acordo com a espécie de *Leishmania*, principalmente quando se compara os perfis encontrados nas células infectadas por *L. braziliensis* com as demais (Figura 68).

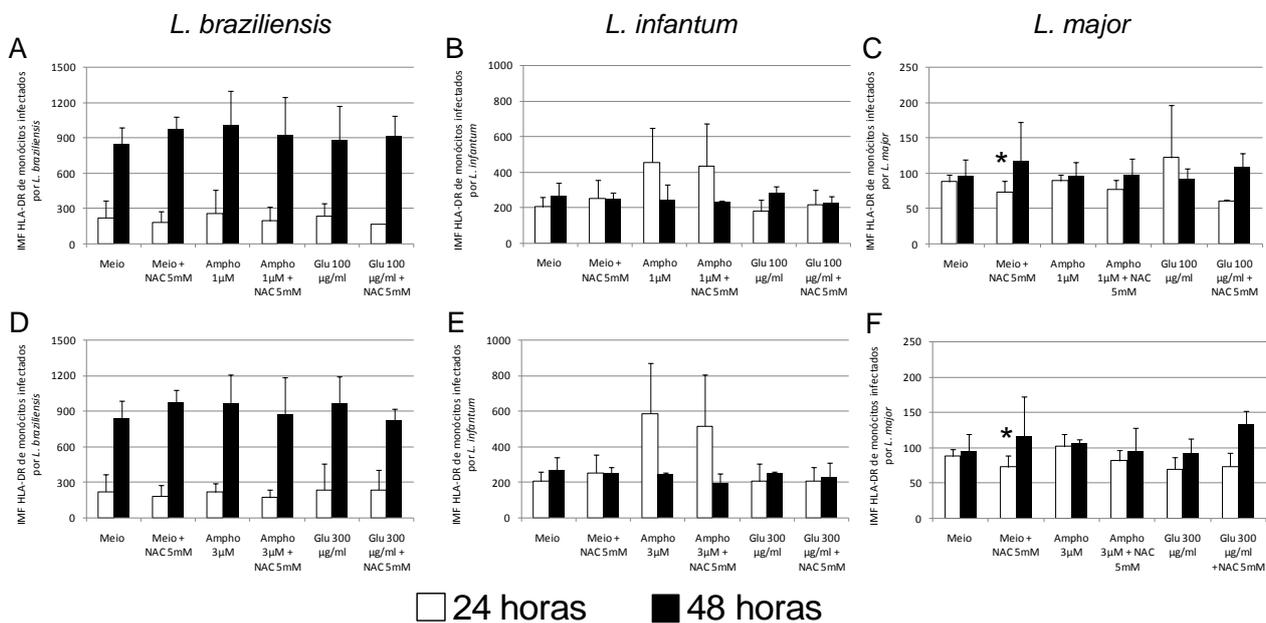


Figura 68: Intensidade média de fluorescência de HLA-DR em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1 e 3 µM) e Glucantime® (100 e 300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 e 3 µM) e Glu. (100 e 300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e HLA-DR e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Em seguida, realizaram-se as avaliações da expressão das citocinas intracelulares. A primeira citocina avaliada foi TNF. Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos nas diferentes espécies de *Leishmania* nas concentrações de 1µM de

anfotericina B e 100µg/ml de Glucantime® (Figura 69). Mais uma vez observou-se uma mudança no perfil de produção dessa citocinas nas células infectadas pelas diferentes espécies de *Leishmania*.

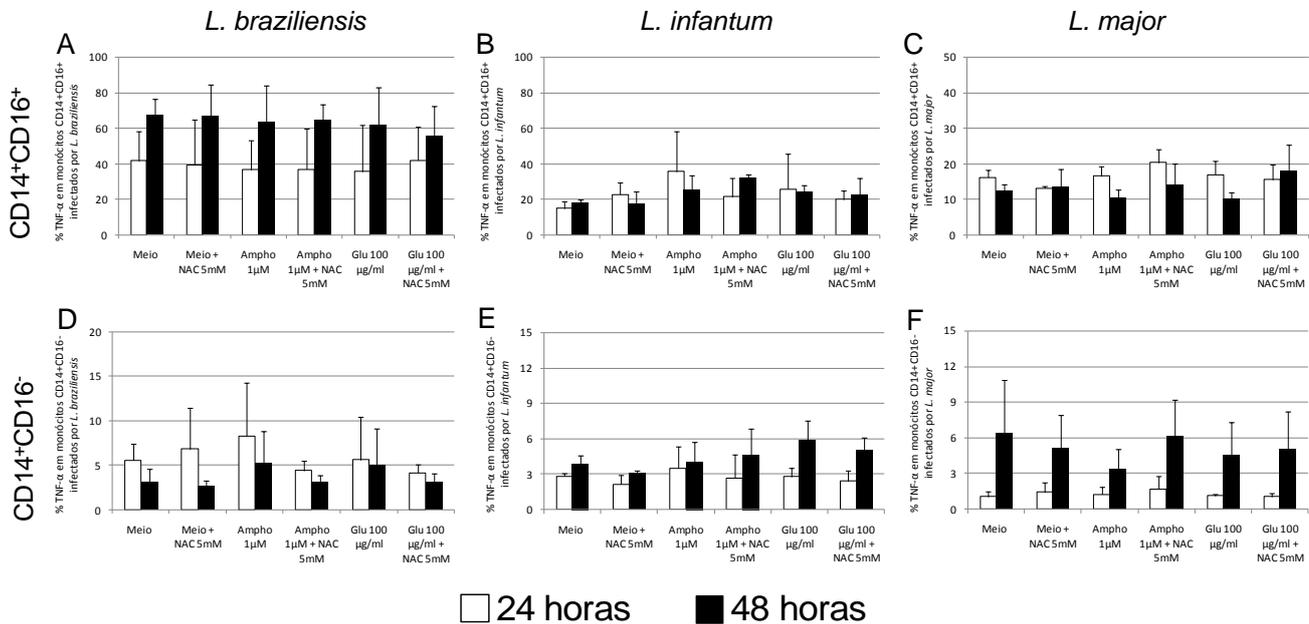


Figura 69: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM) ou meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e TNF e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Quando se utilizou uma concentração maior de droga, notou-se que o tratamento com anfotericina B por 24 horas aumentou a expressão de TNF nos monócitos CD14+CD16+ infectados por *L. braziliensis* (Figura 70 – A). O tratamento com Glucantime® associado a NAC também aumentou a produção de TNF nesse subtipo de monócito infectado por *L. major* (Figura 70 – C).

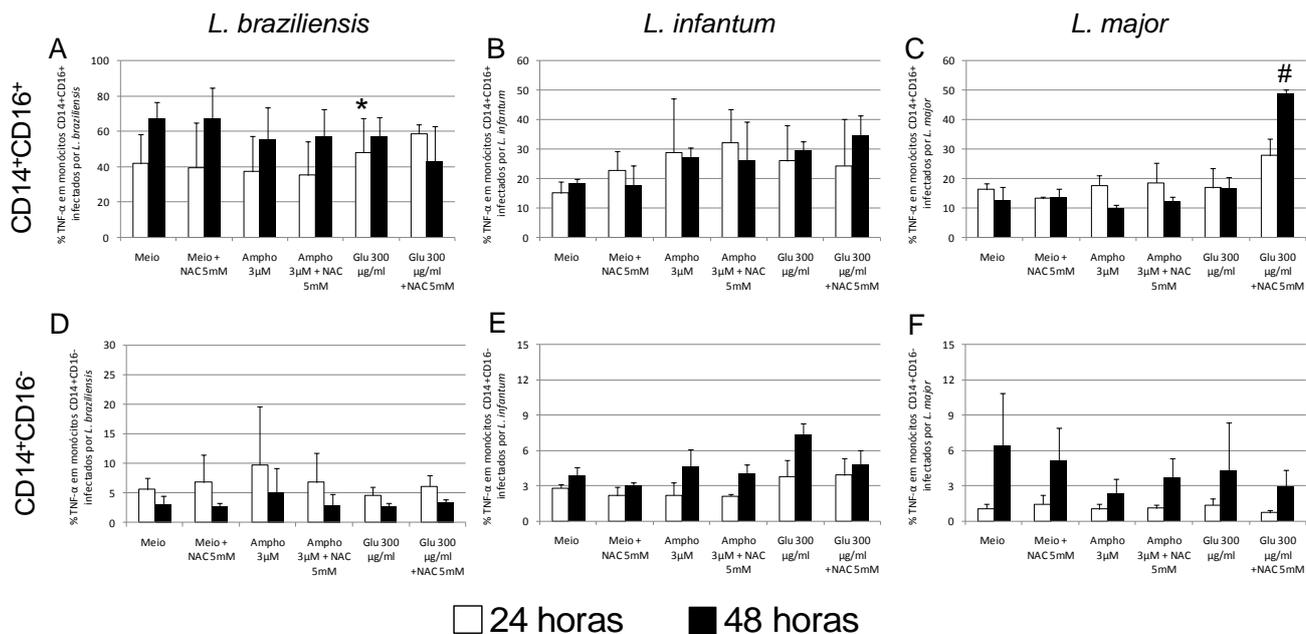


Figura 70: Expressão de TNF em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e TNF e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

A segunda citocina analisada foi IL-6. Não se encontraram diferenças entre os tratamentos em relação ao controle nos monócitos infectados por *L. braziliensis*. Já no subtipo CD14⁺CD16⁻ infectado por *L. infantum*, no tempo de 48 horas, o tratamento com anfotericina B, independentemente da presença do NAC, induziu aumento na expressão dessa citocina (Figura 71 – E). Ainda analisando esse subtipo de monócito infectado por *L. major*, o tratamento com NAC apenas também induziu aumento na expressão em relação ao controle em 48 horas de cultura (Figura 71 – F).

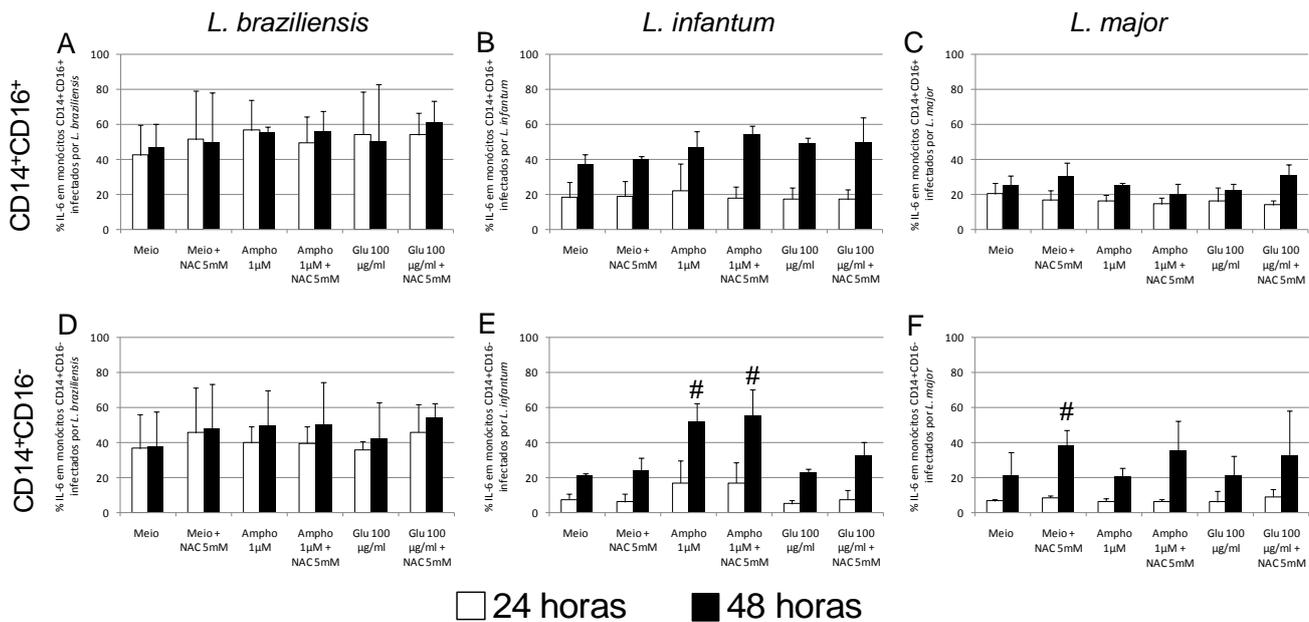


Figura 71: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associados ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-6 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Analisando a expressão de IL-6 em uma concentração maior das drogas leishmanicidas, observaram-se outras diferenças na expressão de IL-6 entre os tratamentos (Figura 72). Nos subtipos de monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. infantum*, houve aumento na produção dessa citocina nas células tratadas com anfotericina B+NAC, e Glucantime® associado ou não a NAC, em relação a condição meio (Figura 72 – B). Nos monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. major*, também encontrou-se aumento na expressão de IL-6 nas células tratadas com Glucantime®+NAC (Figura 72 – C).

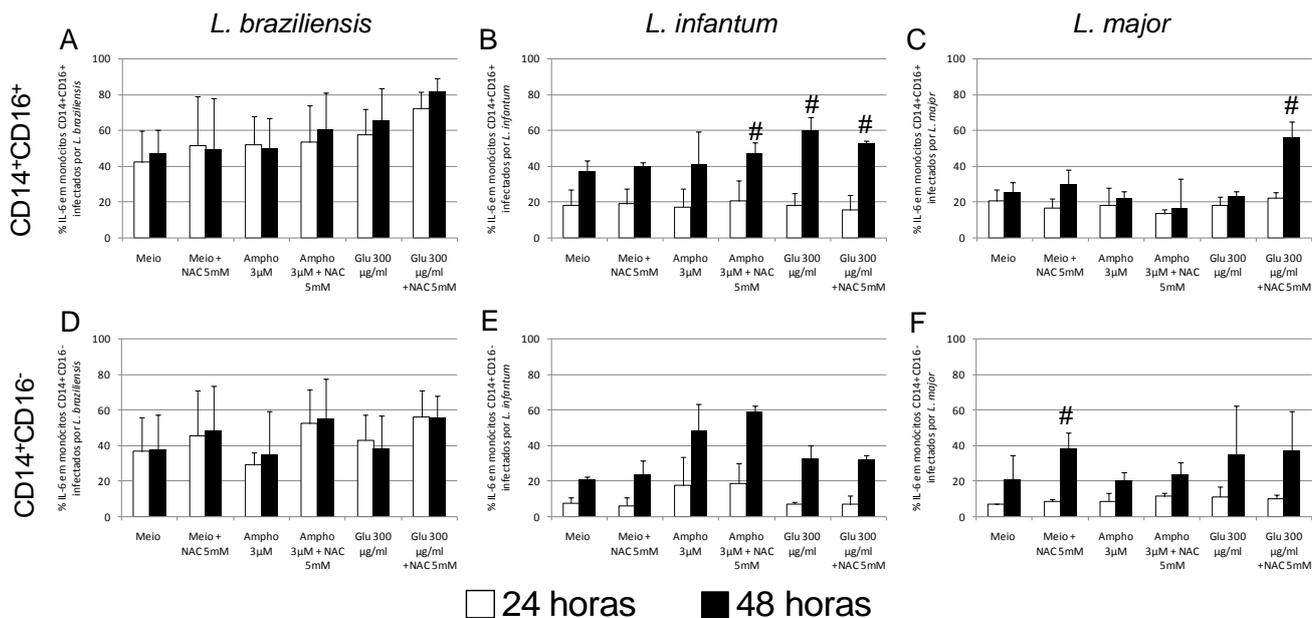


Figura 72: Expressão de IL-6 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associados ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-6 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Assim como foi mencionado na parte 2-A dessa tese, a citocina IL-12 é produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos. No entanto, realizou-se a avaliação da produção dessa citocinas nos dois subtipos de monócitos tratados com NAC e as drogas leishmanicida.

Como demonstrado na figura 73, no subtipo de monócito CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* por *L. infantum*, houve aumento na expressão dessa citocina quando tratado com NAC no tempo de 48 horas de cultura (Figura 73 – B). Não houve alteração na expressão de IL-12 quando NAC estava associado às drogas leishmanicidas. Contudo, neste subtipo de monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, observou-se aumento na expressão de IL-12 após tratamento com anfotericina B por 24 horas de cultura (Figura 73 – C). Com relação a subpopulação CD14⁺CD16⁻, não se observaram diferenças entre os tratamentos nas células infectadas pelas diferentes espécies de *Leishmania* (Figura 73).

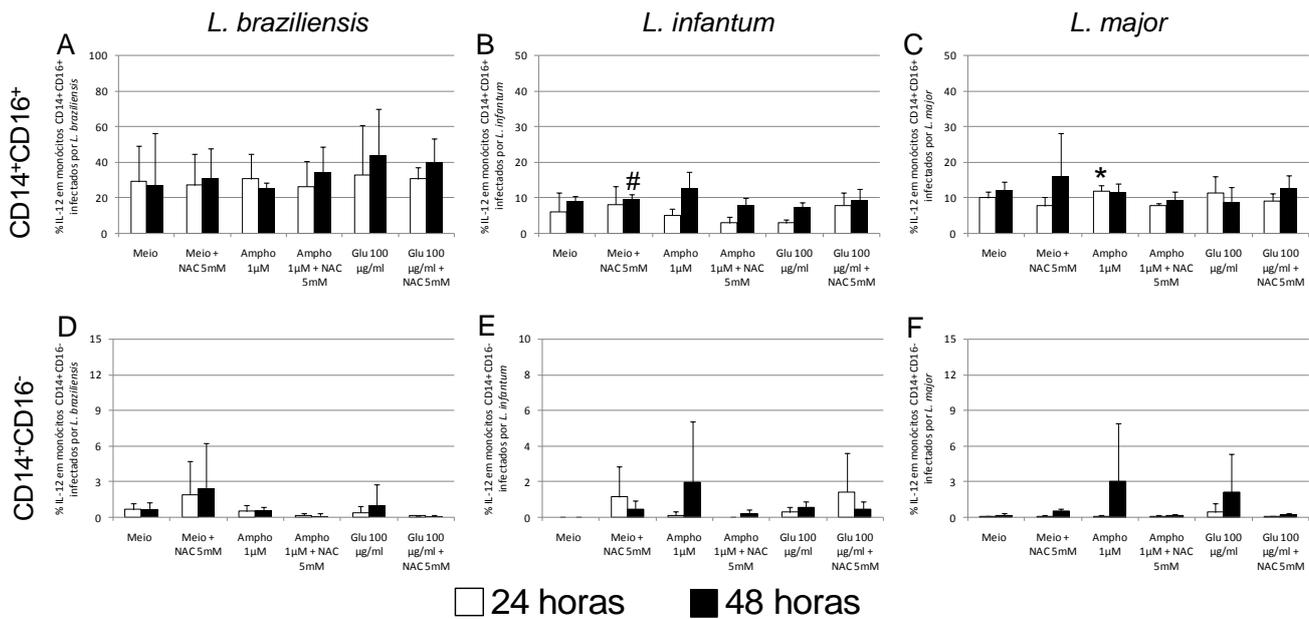


Figura 73: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1µM) e Glucantime® (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associados ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-12 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Ainda avaliando-se a expressão de IL-12, quando se utilizou uma concentração 3 vezes maior de drogas leishmanicidas, encontraram-se diferenças entre os tratamentos nos monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados por *L. major* e tratados por 48 horas com Glucantime® associado a NAC (Figura 74 – C).

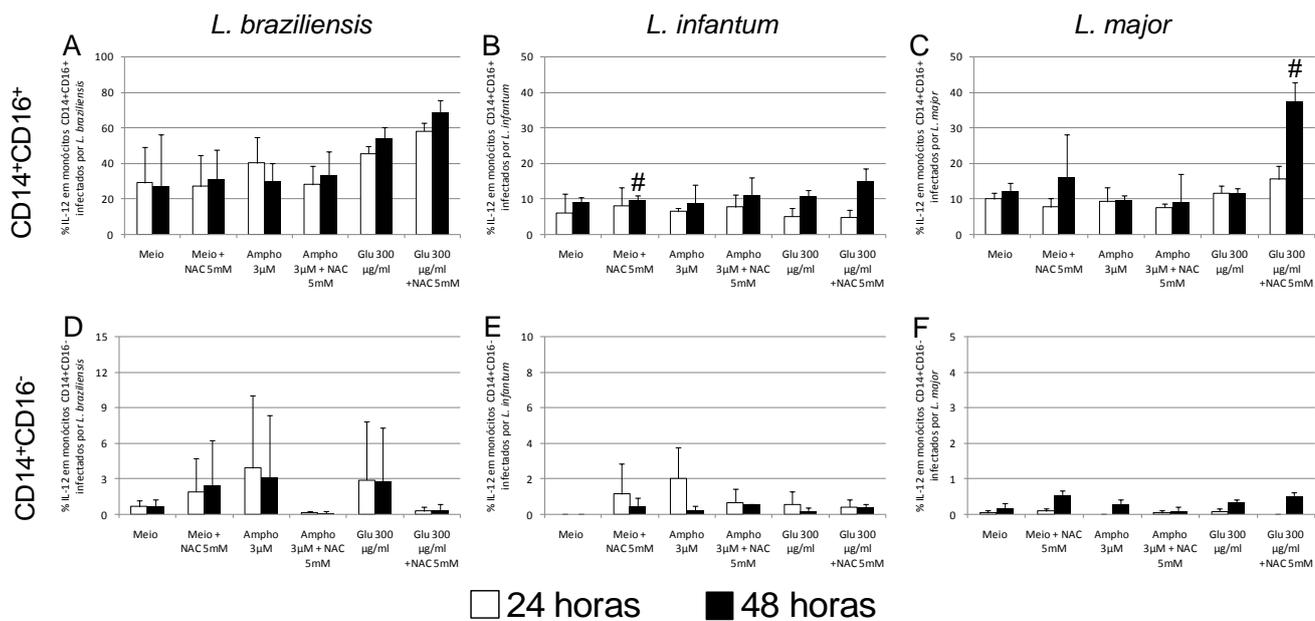


Figura 74: Expressão de IL-12 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM). CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associados ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-12 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo.

Para finalizar a caracterização dos monócitos tratados com drogas leishmanicidas, associados ou não a NAC, avaliou-se a produção intracelular de IL-10 por essas células após 24 ou 48 horas de cultura (Figura 75 e 76).

Os monócitos tratados com Glucantime® (100µg/ml) associado a NAC apresentaram uma redução na produção dessa citocina nas células CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L. infantum* e tratadas por 48 horas (Figura 75 – B). No subtipo CD14⁺CD16⁻ infectado por *L. major*, observou-se também uma redução na expressão de IL-10 após tratamento com Glucantime® por 48 horas (Figura 75 – F). Esses resultados não foram vistos após associação com NAC.

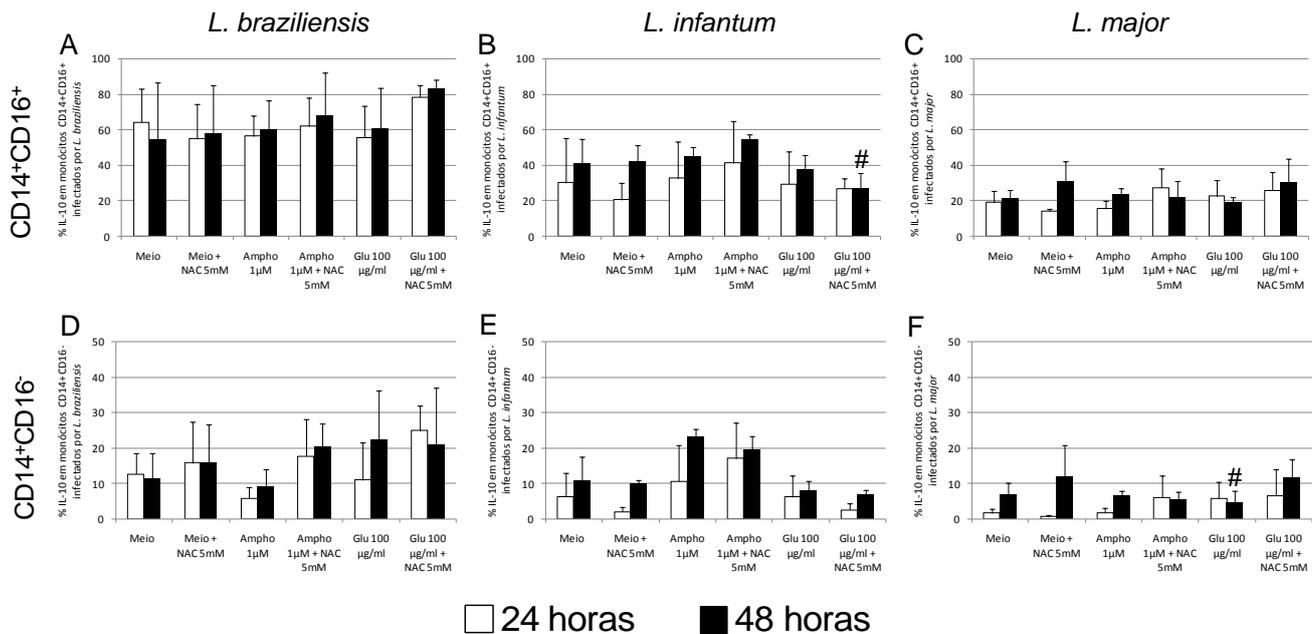


Figura 75: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (1 µM) e Glucantime® (100 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (1 µM) e Glu. (100 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-10 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em médias e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre a condição Meio e as diferentes drogas para o tempo de 24 horas e (#) para o tempo de cultura de 48 horas.

Em uma concentração 3 vezes maior de droga leishmanicida, notou-se um aumento na expressão de IL-10. Os monócitos CD14+CD16+ infectados por *L. braziliensis* e tratados por 24 horas com Glucantime®+NAC aumentaram a expressão de IL-10 (Figura 76 – A). Resultado semelhante foi encontrado nesse subtipo de monócito infectado *in vitro* por *L. major*, no entanto, com 48 horas de cultura (Figura 76 –C).

Nos monócitos CD14+CD16+ infectados por *L. infantum*, houve aumento na produção intracelular de IL-10 nas células tratadas com anfotericina B associado a NAC (Figura 76 – B).

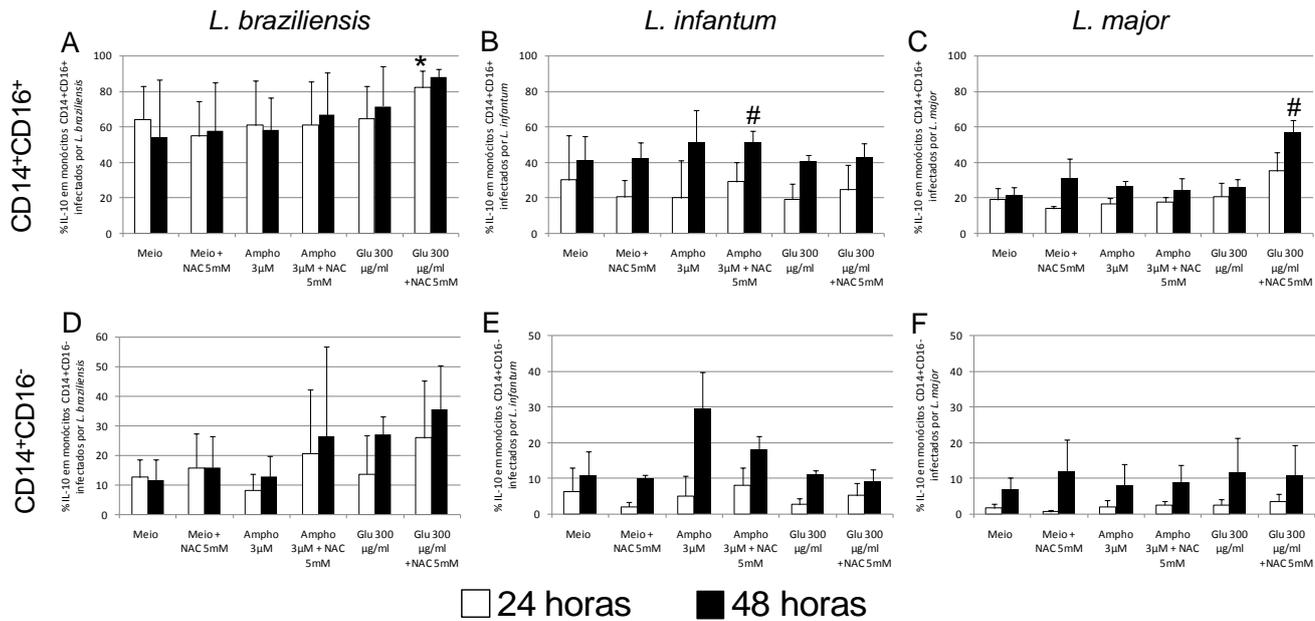


Figura 76: Expressão de IL-10 em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* após 24 ou 48 horas de tratamento com anfotericina B (3µM) e Glucantime® (300µg/ml), associado ou não a NAC (5mM).

CMSP de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* por promastigotas de 3 diferentes espécies de *Leishmania*. Após 24 ou 48 horas de cultura com Ampho B (3 µM) e Glu. (300 µg/ml), associado ou não a NAC (5mM), e meio (controle negativo) as células foram marcadas para CD14, CD16 e IL-10 e os dados foram coletados utilizando-se um citômetro de fluxo e analisados no software Flowjo. (A e D) representam os monócitos infectados por *L. braziliensis*. (B e E) representam os monócitos infectados por *L. infantum*, e (C e F) representam os monócitos infectados por *L. major*. As barras brancas representam a avaliação no tempo de 24 horas e as barras pretas no tempo de 48 horas. Resultados expressos em média e desvio padrão, com n=3 indivíduos para cada grupo.

Muitos foram os resultados obtidos até então. Dessa forma, construíram-se tabelas com o intuito de sumarizar os resultados encontrados na imunofenotipagem para marcadores de ativação e a produção de citocinas após tratamento com as drogas anfotericina B, Glucantime®, associados ou não a NAC (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10: Sumário dos resultados da expressão de moléculas co-estimuladoras após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

%	[] Droga	Subtipo monócito	<i>Leishmania braziliensis</i>								<i>Leishmania infantum</i>								<i>Leishmania major</i>								
			Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		
			24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24
CD11b	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	↑	↑
CD80	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	↑	-	-	-	-	↓	↑	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD86	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↓	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	↑	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	↓	-	-	-	-	-	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	↓	↓	-	-	↓	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
HLA-DR	[] A		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	[] B		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1µM), Glucantime (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).

[] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3µM), Glucantime (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).

- = SEM alterações na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

↓ = REDUÇÃO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

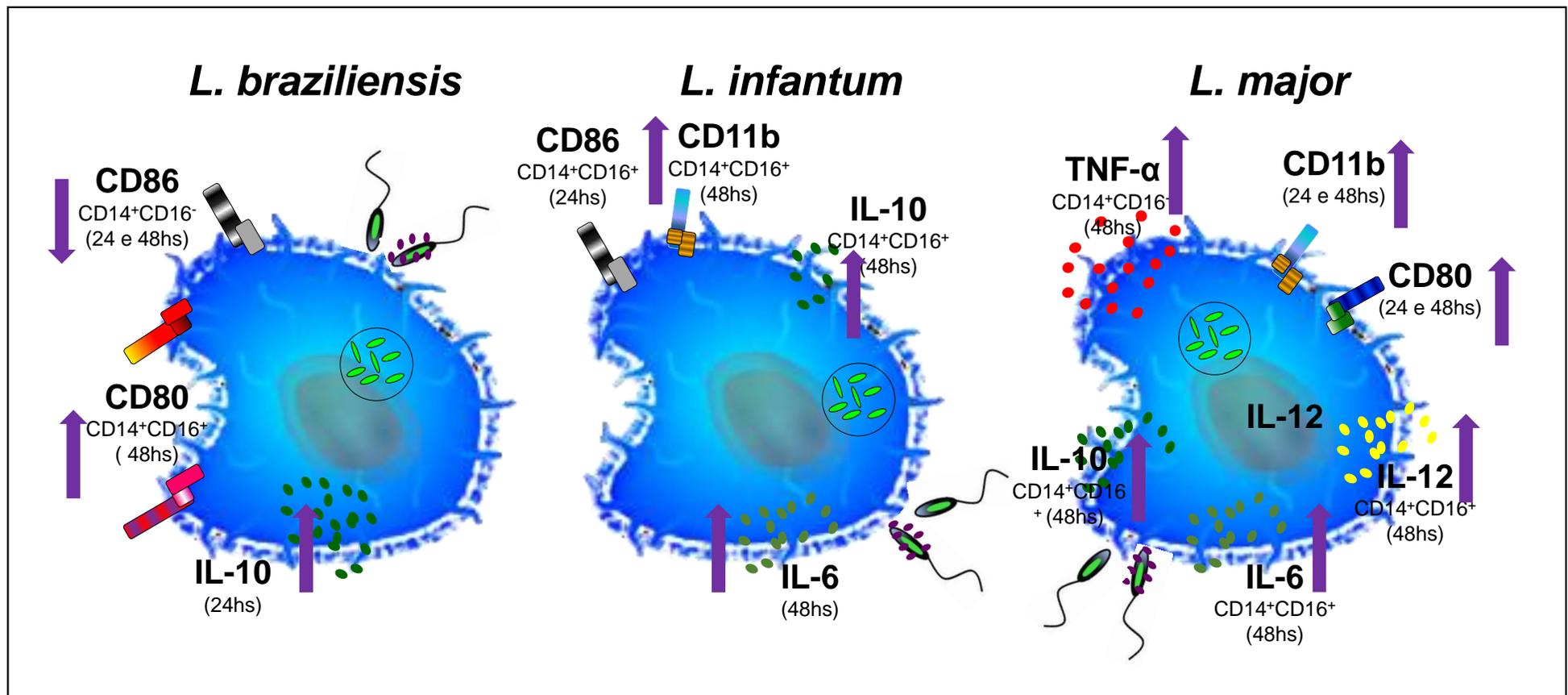
↑ = AUMENTO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

Tabela 11: Sumário dos resultados da expressão de citocinas após 24 ou 48 horas de cultura com as drogas drogas anfotericina B e Glucantime®, associados ou não a NAC, em monócitos de CMSP de indivíduos saudáveis e após infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*

%	[] Droga	Subtipo monócito	<i>Leishmania braziliensis</i>								<i>Leishmania infantum</i>								<i>Leishmania major</i>									
			Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC		Ampho.B		Ampho.B +NAC		Glu.		Glu. + NAC			
			24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
TNF	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-6	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-12	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IL-10	[] A	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	
	[] B	CD14 ⁺ CD16 ⁺	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	
		CD14 ⁺ CD16 ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

[] A = Concentração da droga A: anfotericina B (1µM) e Glucantime (100µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).
 [] B = Concentração da droga B: anfotericina B (3µM), Glucantime (300µg/ml), associados ou não a NAC (5mM).
 - = SEM alterações na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.
 ↓ = REDUÇÃO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.
 ↑ = AUMENTO na frequência de expressão (%) em relação ao controle negativo Meio.

Sumário ilustrando os resultados obtidos do tratamento com NAC em CMSP infectadas pelas diferentes espécies de *Leishmania*.



Diante dos resultados que caracterizam e avaliam a atividade leishmanicida de drogas utilizadas para tratamento padrão, bem como de novas possibilidades terapêuticas, acredita-se que a continuidade e aprofundamento dos mecanismos de ação desses compostos são de fundamental importância para torná-los fortes candidatos a ensaios clínicos envolvendo pacientes infectados por diferentes espécies de *Leishmania*.

6.0 – DISCUSSÃO

6.1 – Parte 1- Avaliação Imunofenotípica de Monócitos CD14⁺ Presentes no Sangue Periférico de Indivíduos com Leishmaniose Cutânea

A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, apresentando formas moderadas e graves, dependendo de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito, incluindo a espécie da *Leishmania* infectante. A leishmaniose cutânea é a forma mais frequente e abrangente no Brasil. O balanço entre a resposta imunológica e o parasito é crucial para a saúde do hospedeiro. No hospedeiro vertebrado, os parasitos do gênero *Leishmania* são patógenos intracelulares que infectam células fagocitárias, inicialmente neutrófilos e em seguida macrófagos, sendo que este último é considerado a célula mais importante por abrigar o parasito durante a infecção. Macrófagos ativados são responsáveis pela morte intracelular do parasito, associada à produção de IFN- γ e TNF pelas células Th1 (Bottrel, Dutra et al. 2001; Antonelli, Dutra et al. 2004).

Embora a resposta do tipo Th1 seja essencial na resolução da leishmaniose, o controle da exarcebação desta resposta é importante para evitar o dano tecidual excessivo (Bacellar, Lessa et al. 2002; Antonelli, Dutra et al. 2005; Faria, Gollob et al. 2005; Gaze, Dutra et al. 2006; Carvalho, Passos et al. 2007). Neste trabalho, caracterizou-se o envolvimento de monócitos pelo estudo da frequência de expressão de moléculas co-estimuladoras, produção de citocinas e expressão intracelular de TLR9 em pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea e comparado a indivíduos não infectados.

A habilidade dos monócitos/macrófagos de atuarem ativamente na apresentação de antígenos é determinada, a princípio, pela expressão do complexo HLA-DR/peptídeo, que promove o primeiro sinal em células T, e pelas moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) que induzem o segundo sinal de ativação ou supressão, dependendo do ligante, CD28 ou CTLA-4, respectivamente. A expressão de CD40, CD80 e CD86 influenciam a ativação de células T e B por meio do primeiro e segundo sinal (Kin and Sanders 2007; Jain, Chodisetti et al. 2011). O segundo sinal induzido por esses receptores é extremamente importante para estabelecer a ativação celular, proliferação, diferenciação, sobrevivência e geração de células T e B de memória (Abou Fakher, Rachinel et al. 2009; Maroof, Beattie et al. 2009; Jain, Chodisetti et al. 2011). Bathia e colaboradores (2005)

demonstraram que CD80 e CD86 adotam diferentes estados oligoméricos na superfície celular, com mecanismos de transdução de sinal diferencial na ativação de células T (Bhatia, Edidin et al. 2005).

Devido à importância das moléculas CD80 e CD86 nos processos de ativação celular, avaliamos sua expressão em monócitos de indivíduos com leishmaniose cutânea, estimulados ou não com SLA. Nossos resultados mostraram que a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 e CD86 em pacientes com LC foi menor quando comparada com indivíduos não infectados (Figura 10). De forma bastante interessante, têm sido demonstrados que CD80 recruta e se liga preferencialmente a CTLA-4, enquanto CD86 recruta preferencialmente CD28. Essa diferença de ligação promove a inibição e ativação celular por CD80 e CD86, respectivamente (Linsley, Greene et al. 1994; Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004). Os resultados encontrados demonstraram que ambas moléculas co-estimuladoras apresentaram sua expressão reduzida nos monócitos com LC ativa em relação aos controles, o que pode induzir uma resposta compensatória nas células humanas por outros receptores, como a sinalização de TLR nos pacientes. No entanto, os resultados encontrados não nos permitem sugerir quais os mecanismos induziram essas alterações. Se o parasito foi o responsável direto por induzir a baixa expressão desses receptores, ou se essa supressão na resposta imune foi desencadeada por características da célula do hospedeiro, ou se foram ambas as possibilidades.

Farina e colaboradores (2004), de forma interessante, demonstraram que, enquanto IFN- γ eleva a expressão de CD80 e CD86 em monócitos, o estímulo com LPS regula negativamente essas moléculas (Farina, Theil et al. 2004).

Em modelos experimentais, o bloqueio de CD86 em camundongos susceptíveis a infecção por *Leishmania* e infectados por *L. major*, levou a uma redução na produção de citocinas Th2, reduzindo a carga parasitária (Brown, Titus et al. 1996). Carrada e colaboradores (2007) demonstraram que indivíduos infectados por *Leishmania mexicana* apresentaram a forma clínica difusa da leishmaniose, com elevada expressão de CD86 nos monócitos, sugerindo além da indução da resposta Th2, há a indução de tolerância ao antígeno de *Leishmania* (Carrada, Caneda et al. 2007). Outro estudo descreveu a importância de moléculas co-estimuladoras na resposta imunológica de pacientes com leishmaniose cutânea (Favali, Costa et al. 2005). Os achados encontrados nessa tese sugerem que houve reflexo da doença local na ativação sistêmica, uma vez que se encontraram alterações na expressão das moléculas co-estimuladoras nos monócitos de pacientes com LC infectados por *L. braziliensis*. Trabalhos realizados por nosso grupo

demonstraram que células de pacientes com LC, com fenótipo específico, e presentes no sangue periférico também foram encontradas no sítio da lesão (Faria, Gollob et al. 2005; Keesen, Antonelli et al. 2011). Keesen e colaboradores (2011) demonstraram que a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ Vβ5.2⁺, além de serem grandes produtores de TNF, IFN-γ e IL-10, e apresentarem alta frequência de expressão para CD45RO e HLA-DR no sangue periférico, foram encontrados nas lesões dos pacientes com LC infectados por *L. braziliensis* (Keesen, Antonelli et al. 2011). Nem sempre é possível utilizar material de lesão para pesquisa. Assim, a informação de que alterações sistêmicas refletem alterações no local da lesão são importantes.

Outro resultado demonstrado neste estudo foi que pacientes com LC apresentaram uma maior frequência de células CD14⁺ expressando CD16 em relação ao controle NI em culturas de células (Figura 10-C). CD16 é um importante indicador de ativação para monócitos. Resultados similares aos demonstrados neste estudo foram encontrados por Pereira e colaboradores (2009) nas mesmas condições, com aumento de 8 vezes na expressão de CD16 nos monócitos de indivíduos infectados por *L. braziliensis* e após estímulo com SLA (Pereira, Dorta et al. 2009). Um dado bastante relevante foi demonstrado por Soares e colaboradores (2006) em que foi observada correlação entre a frequência de células CD14⁺CD16⁺ e área total da lesão em paciente com leishmaniose cutânea (Soares, Barral et al. 2006). Assim, estes resultados indicam que essa subpopulação de monócitos está envolvida na resposta contra a *Leishmania* e que, mesmo na ausência de estímulo adicional *in vitro*, encontram-se ativadas. É possível que o estímulo pela infecção ativa seja suficiente para ativar essas células, desta forma, observar-se tal ativação em culturas não estimuladas de células dos pacientes com LC.

Nas células apresentadoras de antígenos (APC), a ativação de CD40 é fundamental para decisão do sistema imune de criar uma resposta eficaz ou de tolerância. A disfunção nessa via de sinalização está presente na patogênese de doenças autoimunes, aterosclerose e sepse (Wang, Ding et al. 2011). A molécula CD40 também foi avaliado nesse estudo. No entanto, não se encontrou diferenças na expressão desse marcador nos pacientes com LC quando comparado aos indivíduos NI, e entre as condições de cultura (dados não mostrados). Observou-se, então, que os mecanismos que alteraram a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 não alteraram a expressão do CD40, mostrando que a regulação da expressão dessas moléculas é distinta durante a leishmaniose.

Diante dos resultados encontrados com relação a expressão de CD40, CD80 e CD86 nos monócitos CD14⁺, realizaram-se análises de correlação entre essas moléculas,

e o que se encontrou neste estudo foi uma relação entre as mesmas e a produção da citocina IL-12 (Figuras 14 a 16). Assim, encontrou-se correlação positiva entre a frequência das células CD14⁺CD80⁺ e das células CD14⁺CD40⁺ na condição *ex vivo* e SLA (Figura 14). Essas mesmas subpopulações celulares correlacionaram-se positivamente com os monócitos CD14⁺ produtores de IL-12 na condição SLA (Figura 15).

Em contraste, e de forma bastante interessante, as frequências das células CD14⁺CD80⁺ e CD14⁺CD40⁺ correlacionaram-se negativamente com a frequência dos monócitos CD14⁺CD86⁺ (Figura 16). Esta correlação negativa indica que a expressão de CD80 e CD86 regula-se de forma distinta em pacientes com LC. Corroborando essa hipótese, recentemente, foi demonstrado e sugerido, em doenças humanas, que a expressão de CD80 é regulada positivamente, enquanto a expressão de CD86 é regulada negativamente de acordo com o aumento da gravidade da inflamação em modelos animais e na sepse humana (Nolan, Kobayashi et al. 2009).

Diversos estudos, inclusive realizados pelo nosso grupo, demonstraram a necessidade do controle da resposta inflamatória na prevenção do desenvolvimento de imunopatologias, como foi visto na leishmaniose mucosa (Bacellar, Lessa et al. 2002; Da-Cruz, Bittar et al. 2002; Antonelli, Dutra et al. 2004; Antonelli, Dutra et al. 2005; Faria, Gollob et al. 2005; Antonelli, Dutra et al. 2006; Gaze, Dutra et al. 2006). A produção de citocinas é fundamental para elucidar o curso e fisiopatologia da leishmaniose. Assim, avaliou-se a produção intracelular de citocinas em monócitos CD14⁺ após 20 horas de cultura na presença ou ausência do estímulo SLA. Observou-se, neste estudo, que os monócitos de indivíduos infectados por *L. braziliensis* apresentaram maior produção de TNF após cultura, tanto na condição meio como na condição SLA, em relação aos indivíduos NI (Figura 14). Esse resultado demonstrou um estado de pré-ativação dessas células na presença da infecção ativa, uma vez que se observou a maior expressão de TNF, sugerindo que, mesmo periféricamente, houve mudança na resposta imune nos indivíduos acometidos por essa doença. Interessantemente, não foram encontradas diferenças na produção de IL-10 e IL-12 em relação as distintas condições de cultura (Figura 15 e 16). No entanto, 4 dos 6 pacientes avaliados apresentaram aumento de IL-10 e TNF, enquanto dois não apresentaram, apesar da ausência de diferença significativa para a expressão de IL-10 ($p=0,054$). A razão por trás dessas diferenças individuais não pôde ser explicada pela gravidade da doença, tempo de lesão, ou idade, mas, provavelmente, por características genéticas ou fatores ambientais comuns no desenvolvimento da doença.

Outro resultado observado foi a baixa produção de IL-12 nos pacientes com LC em relação aos indivíduos NI (Figura 16-B). Os macrófagos, células NK, a citocina IFN- γ , células T CD4⁺ e CD8⁺ são fundamentais para a ação contra *Leishmania spp*, *T.cruzi* e *T.gondii* (Bogdan and Rollinghoff 1999). A citocina IL-12 é crucial para a resposta imune inata e diferenciação para a resposta do tipo Th1 contra protozoários parasitas. Alguns trabalhos também demonstraram que promastigotas metacíclicas de *L.major*, *L.donovani* e outras espécies de *Leishmania*, bem como amastigotas de *L. mexicana* ou *L.major*, não induziram a produção de IL-12(p40) ou da sua forma bioreativa IL-12(p70) em macrófagos derivados da medula óssea e da cavidade peritoneal em modelos murinos, ou em CMSP de humanos (Vieira, Hondowicz et al. 1994; Carrera, Gazzinelli et al. 1996; Bogdan and Rollinghoff 1999). Esses autores também demonstraram que macrófagos sob estímulo de IFN- γ , *Staphylococcus aureus* ou LPS liberam uma menor quantidade de IL-12 quando infectados por promastigotas ou amastigotas de *L.major*, *L.donovani* e *L. mexicana* (Vieira, Hondowicz et al. 1994; Carrera, Gazzinelli et al. 1996; Bogdan and Rollinghoff 1999). Esses resultados, mesmo que demonstrados em macrófagos, e alguns deles em modelos animais, foram semelhantes aos encontrados neste estudo, em que se observou uma redução na produção de IL-12 em relação aos indivíduos não-infectados. Interessante apontar que se observou nesse trabalho, uma diminuição da expressão de CD80 e CD86, assim como de IL-12. Desta forma, pode-se sugerir a hipótese de que a infecção por *Leishmania* induz uma redução da atividade de defesa celular, visando a sobrevivência do parasito, mesmo essa doença apresentando um perfil inflamatório.

Durante as fases iniciais da infecção, o sistema imune inato detecta e responde rapidamente às infecções por protozoários, sendo essa resposta atribuída aos receptores da imunidade inata. Na ausência do reconhecimento por esses receptores, o hospedeiro vertebrado é rapidamente infectado pelo parasito. Em contra partida, se a resposta desencadeada por esses receptores é excessiva, uma grande quantidade de mediadores pro-inflamatórios, como IFN- γ e TNF, poderia ser prejudicial ao hospedeiro por exacerbar a resposta imunológica. Dessa forma, a resposta inata e os receptores do tipo Toll (TLR) orquestram o desenvolvimento da resposta imune inata, sendo essa última fundamental para o controle da infecção aguda e o desenvolvimento de uma proteção mais longa e efetiva pela imunidade adquirida.

Diversos são os TLR, no entanto o receptor TLR9 é um receptor intracelular presente em células da imunidade inata, e sua caracterização e funcionalidade em outras doenças infecciosas causadas por protozoário já vem sendo estudadas, incluindo na leishmaniose (Bafica, Santiago et al. 2006; Gazzinelli and Denkers 2006; Franklin,

Parroche et al. 2009; Tuon, Fernandes et al. 2010; Carvalho, Petritus et al. 2012). Assim, avaliou-se a expressão desse importante receptor em monócitos de indivíduos com LC.

Nos resultados apresentados neste estudo, avaliou-se a expressão de TLR9 na presença e ausência de estímulo SLA em indivíduos NI e em pacientes com LC (Figura 17). Nos pacientes com LC, encontrou-se aumento dos monócitos CD14⁺ expressando TLR9 após estímulo com SLA quando comparados com o controle NI, bem como quando se compararam as condições meio e SLA (Figura 17). TLR9 reconhece motivos não metilados CPG presentes no DNA, sendo um importante indutor da resposta pró-inflamatória, principalmente, para produção de citocinas durante a infecção por protozoários. Alguns estudos demonstraram que o DNA de protozoários parasitos como *T. cruzi* e *T. brucei* estimulam a ativação tanto de macrófagos como de células dendríticas (Bafica, Santiago et al. 2006; Gazzinelli and Denkers 2006). Em modelos animais para leishmaniose visceral, células dendríticas mielóides foram essenciais na indução da citotoxicidade por células NK, bem como na liberação de IFN- γ *in vivo*, demonstrando que os TLR9, as células dendríticas mielóides e a IL-12 estão funcionalmente ligados na ativação de células NK (Liese, Schleicher et al. 2007; Schleicher, Liese et al. 2007).

É interessante observar que o receptor TLR9 apresentou aumento nos pacientes com LC e após estímulo com SLA, o que não ocorreu nos indivíduos NI na mesma condição de cultura. A resposta específica às proteínas presentes no SLA sugere que, de alguma forma, os pacientes infectados por *L. braziliensis*, durante o processo de formação da lesão, liberam proteínas específicas devido o processo inflamatório desencadeado no local, estimulando as células de maneira específica. Esse processo pode ocorrer, concomitantemente, com o estímulo das células por TNF, que se encontra aumentado nesses pacientes exarcebando ainda mais a expressão desse receptor.

Uma das características clínicas mais relevantes da leishmaniose cutânea é a presença da lesão na pele. Assim, análises de correlação foram realizadas entre a frequência de células CD14⁺TLR9⁺ e a área total da lesão, hipotetizando que essa correlação possa refletir a presença de monócitos altamente ativos, com potencial inflamatório, no sítio da lesão. Como resultados, demonstrou-se uma correlação positiva entre a alta frequência de monócitos CD14⁺TLR9⁺ e a área total da lesão (Figura 18), expandindo ainda mais resultados anteriormente obtidos por nosso grupo de pesquisa, que encontrou correlação entre essa característica clínica com ativação celular e produção de citocinas inflamatórias em linfócitos (Antonelli, Dutra et al. 2005; Keesen, Antonelli et al. 2011). Assim como foi citado anteriormente, há uma baixa expressão de moléculas co-estimuladoras e de IL-12, o que pode sugerir um mecanismo desencadeado

pelo parasito, com o intuito de garantir sua sobrevivência, ou pode ser uma resposta desencadeada pelos monócitos dos pacientes com LC na tentativa de se evitar uma resposta inflamatória descontrolada. Embora estes dados pareçam contraditórios à luz do aumento da expressão de TLR-9 interpretada como uma ativação, deve-se lembrar que vias de resposta celular distintas podem co-existir. De fato, o balanço entre elas parece ser fundamental no desenvolvimento da doença, assim como na adaptação parasito-hospedeiro. Por exemplo, observa-se elevada produção de IFN- γ e também IL-10 em leishmaniose e doença de Chagas (Gollob, Antonelli et al. 2005).

Poucos são os estudos que avaliam a expressão de TLR9 em monócitos de pacientes com LC. Tuon e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de TLR9 na lesão de pacientes com LC e demonstraram que a presença desse receptor estava associada a granulomas, e também foi expresso por macrófagos nessas lesões (Tuon, Fernandes et al. 2010). Os resultados demonstrados nesta tese sugerem que o TLR9 está envolvido na resposta contra a *Leishmania* em pacientes com LC, podendo ser útil como um importante marcador para o desenvolvimento da doença ou sua gravidade. Estes resultados podem contribuir para novas abordagens terapêuticas para doenças negligenciadas causadas por parasitas intracelulares.

Tais resultados também sugerem que essas células apresentaram uma dinâmica com relação a expressão dos marcadores co-estimuladores, no entanto, os resultados encontrados até o momento não permitem sugerir qual o papel desempenhado por cada citocina e marcadores de ativação nesse dinâmica. Sabe-se que a resposta desencadeada por essas moléculas co-estimuladoras inclui a produção de citocinas, ativação de linfócitos T, indução de apoptose, bem como a produção de óxido nítrico, fundamental para o início de uma resposta imunoefetora das células hospedeira em relação ao parasito.

Acredita-se, assim, que essas moléculas exerçam um importante papel no início do desenvolvimento da leishmaniose cutânea humana. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser feitos, com o intuito de estabelecer quais os efeitos e mecanismos desencadeados por esses receptores.

6.2 - Parte 2- Efeito Leishmanicida de Diferentes Drogas em Culturas de *Leishmania* e em CMSP Infectadas *in vitro* por Diferentes Espécies

A leishmaniose é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade. Diferentes são os parasitos que podem causar essa doença, e a espécie envolvida depende da sua distribuição geográfica. A doença pode ser manifestada como uma ulceração simples ou difusa, localizada na pele ou em áreas mucosas, causando mutilação e desconfiguração dos indivíduos infectados, além da forma visceral, de maior mortalidade.

A leishmaniose, uma vez diagnosticada, tem como recomendação a realização do seu tratamento. As drogas utilizadas no tratamento desta doença causam graves efeitos colaterais devido a sua alta toxicidade, o que pode levar a interrupção do tratamento pelo paciente e a resistência da espécie ao medicamento. Diante desse contexto, a busca pelo desenvolvimento de novos protocolos e quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose é crescente. Estudos com o intuito de reduzir os problemas encontrados nos atuais medicamentos, aumentando sua eficiência, reduzindo sua toxicidade, ou aliando novas possibilidades terapêuticas às já existentes, são cada vez mais realizados (Grogl, Thomason et al. 1992; Almeida, Brito et al. 2005; de Souza, Yokoyama-Yasunaka et al. 2006; Barroso, Marco et al. 2007; Machado, Lessa et al. 2007; Goto and Lindoso 2010; da Cunha-Junior, Pacienza-Lima et al. 2011; Pelissari DM 2011).

As diferentes respostas clínicas da LC, LMC e LV ao tratamento utilizando antimônio pentavalente são um problema no processo de cura dos pacientes. Duas formulações de antimônio pentavalente são utilizados atualmente: o estiboglucanato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Ambos medicamentos foram desenvolvidos em 1945, sendo este último utilizado no Brasil e distribuído pelo Ministério da Saúde (Pelissari DM 2011).

Os antimônios pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da *Leishmania*, na glicólise e beta-oxidação, que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo de ação é o de ligação com sítios sulfidrílicos, levando a morte desses parasitos (Firdous, Yasinzai et al. 2009; Goto and Lindoso 2010).

Uma segunda opção de tratamento é a utilização da anfotericina B. Os primeiros relatos da eficiência da anfotericina B no tratamento da LC foram de Lacaz e Sampaio, no

final da década de 1950 e início de 1960 (Lacaz, Paiva et al. 1959; Sampaio, Godoy et al. 1960). Posteriormente, outros estudos analisaram a utilização da anfotericina B no tratamento da LC e LMC, demonstrando pequeno número de recidivas e melhor ação sobre as lesões mucosas em comparação aos antimônios pentavalentes (Castro 1972).

Atualmente, a anfotericina B é um composto usado para o tratamento de pacientes com LV que são clinicamente resistentes aos antimônios pentavalentes, ou uma segunda possibilidade terapêutica para indivíduos infectados que apresentam co-morbidades associadas que impossibilitam a utilização do Glucantime®. Esse medicamento liga-se, preferencialmente, ao colesterol da membrana plasmática da *Leishmania*, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito (Goto and Lindoso 2010).

A busca por melhores efeitos e baixa toxicidade fez dos compostos naturais atraentes candidatos. Como descrito na revisão da literatura dessa tese, diversos são os estudos que avaliam o efeito leishmanicida desses compostos (Kayser, Kiderlen et al. 2000; Kayser, Kiderlen et al. 2001; Lima, Correia et al. 2004; Santos, Coutinho et al. 2008). O composto avaliado neste estudo foi a naftoquinina DT.15 extraída da *Kigelia agricana*, da família da Biognoniaceae, e estudos prévios demonstraram que naftoquinonas provenientes dessa planta apresentaram ação anti-malária (Malerich, Maimone et al. 2005).

Inicialmente, os resultados obtidos na avaliação do efeito leishmanicida direto em culturas de *L. braziliensis* e *L. major* serão discutidos. Para comprovar o efeito leishmanicida desses compostos utilizaram-se diferentes técnicas experimentais.

Os primeiros compostos avaliados foram anfotericina B e DT.15. Os ensaios de contagem em câmara de Neubauer e diluição limitante demonstraram resultados semelhantes, com baixo número de *Leishmania*, após o tratamento, para ambas as técnicas (Figuras 20 e 21). Esse resultado foi encontrado nos dois tempos de cultura e nas duas concentrações das drogas. Assim, anfotericina B e DT.15 apresentaram efeitos semelhantes por esses métodos de avaliação.

As contagens em câmara de Neubauer foram realizadas às “cegas”, uma vez que as amostras eram codificadas para evitar uma contagem tendenciosa. Já no ensaio de diluição limitante, estimou-se o número de parasitos em cada grupo estudado. Essa técnica é bem descrita na literatura, mas, principalmente em modelos animais, que utilizam as patas de diferentes camundongos por grupo de estudo, maceradas e homogeneizadas de forma asséptica para a suspensão das formas amastigotas (Sampaio, Takano et al. 2003; Barroso, Marco et al. 2007; de Oliveira Cardoso, de Souza Cda et al. 2010). A leitura é feita da mesma forma que a realizada neste estudo, em

microscópio de luz invertida, em que foram contadas as formas promastigotas de cada poço (Sampaio, Takano et al. 2003; Barroso, Marco et al. 2007; de Oliveira Cardoso, de Souza Cda et al. 2010). No entanto, essas técnicas não permitem sugerir os mecanismos de ação da droga DT.15, seja por morte das diferentes espécies de *Leishmania* ou inibição da proliferação. Assim, decidiu-se por introduzir um outro método de análise dos efeitos dessas drogas que pudessem sugerir um mecanismo de ação. Analisou-se, então, a ocorrência de morte celular por marcação de anexina V e PI.

A marcação celular com anexina V (externalização da fosfatidil serina) e PI (integridade da membrana e fragmentação do DNA), avaliam diferentes etapas no processo de morte celular. Por exemplo, células que se apresentaram coradas apenas para PI encontram-se em necrose, uma vez que a integridade da membrana está comprometida, permitindo a entrada desse corante, podendo este também se ligar ao DNA fragmentado. As células coradas para anexina V, estão em processo de apoptose, sendo que, dependendo da etapa, tal processo pode ser reversível. Quando houver a dupla positividade para ambos (anexina V e PI), caracteriza-se a morte celular, com um processo de apoptose avançado e irreversível (Silva, Reis et al.). Neste estudo, buscou-se avaliar qualquer processo de morte, assim, adotou-se como critério de análise a avaliação dos parasitos do gênero *Leishmania* que apresentaram coloração para anexina V, PI ou ambos.

Observou-se nos resultados deste trabalho que DT.15 induziu a morte celular nas duas espécies de *Leishmania*, no entanto, não de forma tão expressiva quanto a droga anfotericina B. Além disso, a taxa de morte foi maior no tempo de 48 horas, sendo que para anfotericina B, houve redução quando se avaliou neste tempo (Figura 24). Dessa forma, a indução da morte celular não foi tão expressiva utilizando-se a droga DT.15, como observado para a anfotericina B (Figura 24).

O mecanismo de ação da anfotericina B envolve a integridade da membrana do parasito, com a ligação do medicamento no ergosterol, induzindo o rompimento da célula por permeabilidade celular. Com relação aos mecanismos de ação das naftoquinonas, esse não é bem elucidado. Além disso, muitos são os fatores que influenciam na sua ação, como o tipo de naftoquinona avaliada, a planta de onde foi extraída, e a qual classe pertence, por exemplo. No entanto, sabe-se que as naftoquinonas atuam no sistema redox das células, protegendo-as contra a ação de ROS. Um estudo também demonstrou que atua como um antagonista da vitamina K, atuando assim em reações químicas dependentes dessa vitamina (Dinnen and Ebisuzaki 1997). Assim, embora tenhamos

observado indução de morte pela droga DT.15, seu mecanismo de ação ainda precisa ser melhor elucidado.

Com relação aos tempos dos tratamentos utilizados nesse trabalho, a partir de dados prévios fornecidos pelo pesquisador que desenvolveu a droga DT.15, e experimentos pilotos realizados, determinamos que os tempos de 24 e 48 horas seriam utilizados devido a viabilidade da droga no meio de cultura e ausência de alterações nos tempos superiores a 48 horas. Assim, tais experimentos auxiliaram na escolha dos tempos e concentrações utilizadas. Estudos *in vitro* realizados por outros grupos de pesquisa também auxiliaram na escolha das concentrações das drogas convencionais (anfotericina B e Glucantime®) (Teixeira, de Almeida et al. 2001; Romao, Tovar et al. 2006)

A droga teste DT.15 utilizada em neste estudo não foi avaliada anteriormente com relação ao seu efeito leishmanicida. O pesquisador Jeremiah Malerich, que desenvolveu o composto utilizado nesta tese, em seu trabalho com outros colaboradores (2005) demonstraram efeito positivo anti-malária de outras naftoquinonas extraídas da *Kigelia africana* (Malerich, Maimone et al. 2005). No entanto, não há estudos prévios ou disponíveis na literatura que avaliaram o composto utilizado em neste estudo.

Lima e colaboradores (2004), demonstraram atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de hidroquinonas e derivados em culturas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* utilizando, como controle positivo, o isotionato de pentamidina, além disso, os métodos utilizados foram distintos aos desta tese. A avaliação da morte da *Leishmania*, *in vitro*, foi realizada pelo índice de citotoxicidade IC₅₀, indicando a concentração da droga que induziu a morte de 50% da população celular no ensaio. Assim, o acetil lisolapacol, uma hidroquinona, apresentou atividade leishmanicida semelhante ao controle positivo (Lima, Correia et al. 2004).

Outro método utilizado para determinar o efeito leishmanicida das drogas foi a coloração do parasito por CFSE e avaliação da proliferação celular. De forma bastante interessante, observou-se que DT.15 inibiu a proliferação das espécies dos parasitos avaliados de forma semelhante ao controle anfotericina B (Figuras 25 e 26), e mais uma vez, sua resposta foi tempo dependente. Assim, observou-se maior efeito no tempo de 48 horas. Com esses resultados, demonstrou-se que a droga DT.15 apresentou ação leishmanicida, afetando a proliferação do parasito, bem como induzindo a morte celular. Ahmad Ali e colaboradores (2011), em um estudo muito elegante, demonstraram a atividade leishmanicida intra e extracelular de diversas naftoquinonas em *L. major*. A avaliação *in vitro* em culturas de amastigotas de *L. major* também foi realizada pelo índice

de citotoxicidade (IC₅₀), sendo observado efeito leishmanicida positivo desses compostos. Além disso, demonstrou-se que modificações na estrutura química das naftoquinonas foram capazes de melhorar sua eficiência, além de elucidar mecanismos de ação, o que torna a avaliação da atividade leishmanicida mais precisa e completa (Ali, Assimopoulou et al. 2011).

Nosso estudo diferencia-se de muitos por avaliar, utilizando a técnica de citometria de fluxo, a morte celular. Essa avaliação nos permite diferenciar qual etapa da morte celular as células que receberam um determinado tratamento se encontram, além de quantificar o processo de morte. O IC₅₀, muito utilizado nos estudos que avaliam morte celular após um tratamento, indica a concentração do extrato que induz 50% de lise ou morte celular. Para determinar o IC₅₀, utilizam-se técnicas como a incorporação do vermelho neutro, obtendo-se uma curva após leitura no espectrofotômetro. Cabe ressaltar que essa análise não nos permite avaliar os mecanismos responsáveis pela indução da morte celular, como a citometria permite.

Assim, sugerimos que DT.15 é um interessante candidato terapêutico no tratamento da leishmaniose, uma vez que apresentou importantes resultados na ação direta ao parasito.

Após avaliar o efeito da DT.15 em culturas de parasitos, perguntamos como essa droga se comportaria em modelos de infecção *in vitro*. Para responder essa pergunta, avaliamos a citotoxicidade desse composto e aspectos imunológicos nas células infectadas. Esse é um ponto importante desse trabalho, não sendo encontrados estudos que avaliem características fenotípicas e funcionais e suas alterações em testes envolvendo novos candidatos terapêuticos. Este é um ponto de grande importância pois pode indicar se uma dada droga possui efeitos no sistema imunológico do hospedeiro, o que pode ter conseqüências diversas, não só em relação ao tratamento da doença em questão, mas na resposta imune em geral. Uma droga ideal, deve levar ao estabelecimento de uma resposta imune adequada, que permita eliminar o parasito mas evitar destruição tecidual.

Desta forma, discutiremos os resultados encontrados nos modelos de infecção *in vitro* de monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis e infectados pelas espécies *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

Mais uma vez, avaliou-se o efeito de DT.15 por diferentes ensaios no modelo de infecção *in vitro* de monócitos por diferentes espécies de *Leishmania*. Inicialmente avaliou-se a morte celular dos monócitos infectados *in vitro* ou não, pela marcação das células por anexina V e PI. Como foi demonstrado na figura 28 e 29 deste estudo, a

infecção por si só já induziu altas taxas de morte celular, independentemente da espécie infectante (Figuras 30 e 31). Levando em consideração o tempo de cultura e a concentração da droga, nas células não infectadas, notou-se que a citotoxicidade de DT.15 foi maior no tempo de 48 horas, e na maior concentração deste composto. No entanto, a anfotericina B apresentou toxicidade no tempo de 48 horas em ambas concentrações, enquanto que o Glucantime® em ambos os tempos e concentrações. Assim, DT.15 apresentou uma toxicidade semelhante aos tratamentos padrões. Interessantemente, nos monócitos infectados, DT.15 não apresentou taxa de morte superior ao controle negativo (condição meio), com exceção das células infectadas *in vitro* por *L. infantum* e tratadas com 9µM de DT.15. Esses resultados mostram que DT.15 não apresentou alta toxicidade em monócitos humanos, o que nos permite inferir que a citotoxicidade em outras células de mamíferos também deve ser baixa. No entanto, considerando-se as diferenças inerentes aos diferentes tipos celulares, mais estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Estudos realizados com naftoquinonas demonstraram que a alta toxicidade e baixa biodisponibilidade são os principais problemas encontrados que justificam a sua pouca utilização (Lima, Correia et al. 2004; Ali, Assimopoulou et al. 2011). O fato de encontrarmos uma citotoxicidade semelhante entre a DT.15 com os tratamentos convencionais indica que, sua utilização, no tempo e concentrações indicados, a tornam um importante candidato terapêutico para avaliações posteriores e em outros modelos de avaliação, como nos modelos *in vivo*. A ausência de resistência do parasito a esse composto, auxiliaria na sua utilização, atuando, principalmente, como adjuvante aos tratamentos padrões.

O tratamento convencional utiliza o antimônio pentavalente como principal medicamento. Firdous e colaboradores (2009), demonstraram que o tratamento com Glucantime®, como preconizado pela OMS, levou a cura de todos os pacientes infectados por *L. major*, residentes em áreas endêmicas da doença no Paquistão (Firdous, Yasinzai et al. 2009). No entanto, esses autores acreditam que novos estudos devam ser realizados com o intuito de avaliar a resistência do parasito ao tratamento.

Os resultados encontrados nesta tese demonstraram como as espécies de *Leishmania* comportaram-se de forma distinta perante os diferentes tratamentos. Tanto anfotericina B quanto Glucantime® não apresentaram efeitos distintos em relação ao controle meio nos monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis*. Nas células infectadas por *L. infantum*, e tratadas com anfotericina B, observou-se alta taxa de morte celular. Esses efeitos são observados independentemente do tempo e concentração das drogas.

Para os monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, o tratamento com Glucantime® foi o maior indutor de morte, principalmente na maior concentração da droga e no maior tempo de cultura (48 horas). Esses resultados nos indicam que a espécie infectante é crucial para escolha do tratamento. De fato, este importante ponto já foi discutido na literatura. Segundo artigo de revisão de Goto & Lindoso (2010), a eficácia do tratamento com antimônio pentavalente depende da região geográfica, espécie de *Leishmania* e apresentação clínica da doença (Goto and Lindoso 2010).

É importante ressaltar que não discutimos a eficiência das drogas padrão, e sim sua eficácia no tratamento do paciente. Atualmente, não há drogas que apresentem eficiência como a anfotericina B e o Glucantime®. No entanto, seus inúmeros efeitos colaterais, levam a interrupção do tratamento, o que favorece a resistência do parasito, reduzem sua eficácia, trazendo, conseqüentemente, prejuízos à sociedade, de forma geral.

A *Leishmania* é um protozoário também conhecido por modular os mecanismos de morte celular nas células infectadas. Zandbergen e colaboradores (2006) demonstraram, em camundongos infectados por *L. major*, que a fagocitose de células apoptóticas pode levar a um “silenciamento” da resposta efetora contra o parasito, e que citocinas do sistema imunológico, como TGF- β , estão envolvidas nesse processo (van Zandbergen, Bollinger et al. 2006). Além disso, condições de estresse oxidativo, produção de ROS e de citocinas como TNF, são situações presentes na leishmaniose humana, e podem induzir morte celular por mecanismos mediados por esfingolípides de ceramida, um mecanismo de apoptose independente da ativação de caspase. O aumento da ceramida sensibiliza a membrana plasmática a expor a fosfatidil serina em células apoptóticas (Hail, Carter et al. 2006). É importante ressaltar que nos dados encontrados nesta tese, a infecção *in vitro* com as diferentes espécies de *Leishmania* foi capaz de induzir altas taxas de morte celular nos monócitos infectados independentemente do tratamento.

Quando se avaliou a taxa de infecção nos monócitos infectados *in vitro*, observou-se que não houve diferença entre as espécies de *Leishmania*, sendo essa taxa superior a 70% (Figura 33). No entanto, a intensidade média de fluorescência (IMF) foi distinta entre os tempos de cultura. As células mantidas em cultura por 48 horas apresentaram maiores valores de IMF que as células mantidas em cultura por 24 horas. Esse resultado foi independente do tratamento utilizado (Figura 34). Além disso, os monócitos infectados *in vitro* por *L. major* e tratados com anfotericina B apresentaram redução na IMF em relação ao meio (Figura 34 – C e F). Realizou-se esse experimento inicialmente hipotetizando que, quanto maior a morte intracelular do parasito pelo monócito, menor na IMF do CFSE.

No entanto, não se encontrou esse resultado. Na literatura, a coloração por CFSE é utilizada para avaliar a proliferação celular ou a taxa de infectividade. Na pesquisa bibliográfica realizada para essa tese, não se encontraram estudos que utilizaram a coloração com o objetivo inicialmente idealizado neste trabalho.

Esses resultados foram surpreendentes, e de difícil explicação. Na metodologia utilizada nesse estudo, os parasitos foram corados, lavados e, em seguida, infectaram as células *in vitro* por 4 horas. Após esse tempo, o excesso de parasitos foi lavado e as células infectadas foram submetidas a cultura, como descrito no item 4.2.8 do material e métodos dessa tese. Dessa forma, notou-se que houve redução na IMF no tempo de 24 horas e não aumento da IMF no tempo de 48 horas, uma vez que os parasitos foram corados e infectaram as células, de forma semelhante, nos dois tempos de cultura. Neste contexto, sugerimos que a redução da IMF no tempo de 24 horas pode ser justificada pela replicação do parasito e sua liberação no meio de cultura. Assim, no tempo de 24 horas, não tenha sido possível reinfectar novas células, o que pode ter ocorrido no tempo de 48 horas. Assim, com excessão das células infectadas por *L. major* e tratadas com anfotericina B que apresentou redução da IMF em relação ao meio, não houve diferenças nos tratamentos avaliados para as outras espécies.

Monócitos humanos, há algum tempo atrás, eram identificados pela expressão da molécula CD14. Atualmente, são classificados funcionalmente pela expressão das moléculas de CD14 e CD16. Os monócitos caracterizados como CD14^{hi}CD16⁻ são denominados monócitos clássicos e corresponde ao maior percentual dessas células no sangue de indivíduos saudáveis (90 a 95%). Outra subpopulação denominada monócitos “não clássicos” ou “pro-inflamatórios” (correspondentes a 5-10 % da população de monócitos), estão associados a expressão de CD16, apresentando o fenótipo CD14⁺CD16⁺ (Strauss-Ayali, Conrad et al. 2007). Essa última população de monócitos vem sendo estudada na leishmaniose cutânea, em que foi demonstrado um maior número dessas células no sangue e lesão de pacientes infectados por *L. braziliensis* (Soares, Barral et al. 2006; Pereira, Dorta et al. 2009).

Dessa forma, neste estudo, caracterizaram-se essas duas populações com relação à expressão de marcadores de ativação e produção de citocinas, após infecção *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania* e tratamento com diferentes drogas. Nessa etapa da discussão serão discutidos os resultados encontrados nos monócitos tratados com anfotericina B, Glucantime® e DT.15 e infectados *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania*.

Quando se avaliou a expressão de CD11b nos diferentes subtipos de monócitos, notou-se que o tratamento com DT.15 (3 μ M) reduziu a expressão desse marcador na subpopulação CD14⁺CD16⁻ no período de 48 horas em células infectadas *in vitro* por *L. braziliensis*. Em monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* por *L. major* também observou-se redução no tempo de 24 horas, e na concentração de 9 μ M (Figura 35 e 36). O tratamento com anfotericina B induziu uma maior expressão de CD11b em monócitos CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* por *L. infantum*. Enquanto o tratamento com Glucantime® levou a um aumento a expressão de CD11b em monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ infectados *in vitro* por *L. major* nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. No entanto, de forma bastante interessante, o que se observou nas figuras 35 e 36 foi um perfil de expressão de CD11b bastante distinto entre as espécies de *Leishmania*, independentemente do tratamento.

CD11b/CD18 é uma integrina (receptor de adesão) envolvida em uma série de funções biológicas, como fagocitose de partículas opsonizadas, citotoxicidade mediada por células, quimiotaxia e reconhecimento de uma gama de ligantes. Essa molécula é a principal responsável pela internalização da *Leishmania* nos macrófagos. Serbina e colaboradores (2012) demonstraram em camundongos infectados por *L. monocytogenes*, que a expressão de CD11b nos monócitos, aliada a expressão de moléculas de adesão endotelial como ICAM-1 foi responsável pela quimiotaxia desses monócitos em lesões hepáticas (Serbina, Shi et al. 2012). Ainda sobre a expressão de CD11b, Cao e colaboradores (2005) demonstraram que CD11b (Mac-1) está envolvido especificamente no efluxo de macrófagos para o sistema linfático, sugerindo que CD11b desempenha um importante papel na remoção de macrófagos inflamatórios do sítio da lesão, sendo sua migração um importante passo para a formação da imunidade adaptativa (Cao, Lawrence et al. 2005). Este grupo também demonstrou outro papel interessante desempenhado pelo CD11b, em que a função anti-inflamatória induzida pela proteína C ativa em macrófagos requer a ligação CD11b/CD18 (Cao, Gao et al. 2010).

Esse receptor é avaliado nesse estudo por suas diversas funções, mas, principalmente pelo fato de ser o receptor utilizado pela *Leishmania* para infectar os macrófagos/monócitos. Assim, o tratamento com DT.15 inibiu a expressão desse receptor em células CD14⁺CD16⁻ infectadas por *L. braziliensis* e CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L. major*. A redução dessa expressão ocorreu após a infecção inicial e tratamento por 48 horas. No entanto, podemos sugerir que, nas futuras infecções por amastigotas presentes no meio de cultura, a redução da expressão desse marcador prejudicaria a sua internalização, o que favoreceria o hospedeiro. A redução desse receptor também

prejudicaria a diapedese dessas células, o que induziria a uma menor quantidade de macrófagos no sítio da lesão. Assim, no aumento da expressão de CD11b encontrado, após os tratamentos com anfotericina B e Glucantime®, ocorreria o contrário, com aumento da internalização do parasito na forma amastigota e diapedese desses monócitos ao sítio inflamatório.

Resultados interessantes também foram encontrados nesta tese com relação a expressão de CD80 e CD86 após a infecção *in vitro* por diferentes espécies e os tratamentos com anfotericina B, Glucantime e DT.15.

As moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, também conhecidas como B7-1 e B7-2, respectivamente, são expressas na superfície de células APC, em especial macrófagos, células dendríticas e monócitos, e interagem com receptores CD28 e CTLA-4, expressos por células T. Como descrito na revisão da literatura desta tese, apesar dos receptores CD80 e CD86 serem homólogos e se ligarem tanto em CD28, quanto em CTLA-4, eles apresentam estrutura bioquímica distinta, assim como diferentes papéis na regulação imune. Bhatia e colaboradores (2005) demonstraram que CD86 está como monómeros na superfície celular, enquanto CD80 forma, predominantemente, dímeros. Essa diferença sugere contrastes nos mecanismos de transdução de sinal envolvendo a ativação de células T (Bhatia, Edidin et al. 2005)

Observou-se, nos resultados obtidos neste estudo, que os tratamentos com as drogas provocaram alterações na expressão de CD80 e CD86 nos monócitos infectados *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania* e submetidos aos diferentes tratamentos. Demonstrou-se que o tratamento com anfotericina B e Glucantime® reduziu a expressão de CD80 em monócitos infectados *in vitro* por *L. infantum*. Enquanto que nas células infectadas por *L. major* observou-se aumento após o tratamento com anfotericina B. Ainda nessas células, o tratamento com DT.15 reduziu a expressão de CD80 (Figura 37). Quando se analisou a expressão de CD80 em uma concentração 3 vezes maior de drogas, os monócitos infectados por *L. infantum* apresentaram redução na expressão de CD80 em todos os tratamentos no tempo de 24 horas. Novamente, DT.15 reduziu a expressão de CD80 nas células infectadas *in vitro* por *L. major*, enquanto o tratamento com Glucantime® aumentou (Figura 38).

Analisando a expressão de CD86, após os tratamentos, observou-se que, nas células infectadas por *L. infantum*, o tratamento com anfotericina reduziu a expressão dessa molécula no tempo de 24 horas, enquanto que Glucantime® aumentou. Resultado similar foi encontrado nos monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, no entanto, no tempo de 48 horas (Figura 39).

Em uma concentração 3 vezes maior das drogas, observou-se que o tratamento com anfotericina B aumentou a expressão desse receptor nas células infectadas pelas diferentes espécies de *Leishmania*. A droga teste DT.15 reduziu a expressão de CD86 no tempo de 24 horas nas células infectadas por *L. infantum* (Figura 40).

Diante destes resultados, observou-se que a droga teste DT.15 reduziu ou manteve a expressão desses marcadores, variando de acordo com a espécie de *Leishmania* analisada. Assim como anfotericina induziu aumento na expressão desses receptores. É interessante ressaltar que, como demonstrado na parte 1 desta tese, os pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentaram uma baixa expressão desses marcadores em relação aos indivíduos não infectados e que os monócitos infectados *in vitro* por *L. braziliensis* praticamente não sofreram alterações após os tratamentos com as drogas. Neste contexto, a utilização de medicamentos que causem alterações na expressão desses receptores deve ser avaliada com cuidado, uma vez que podem influenciar no processo de cura desses pacientes.

Assim, observa-se até o momento que, a anfotericina B induziu a expressão dos receptores co-estimuladores CD11b, CD80 e CD86. No entanto, esse resultado pode ser benéfico ao hospedeiro, por favorecer a eliminação do parasito, levando a resolução da doença; ou prejudicial por exarcebar ainda mais a resposta inflamatória, o que levaria a um maior dano tissular. Desta forma, é fundamental avaliar se estas drogas alteram a expressão de outros fatores imunológicos que pudessem contribuir para o controle da resposta imune após a eliminação do parasito. Desta forma, ter-se-ia uma resposta ativada, favorável à eliminação do parasito no início do tratamento e, posteriormente, o controle desta resposta, evitando a destruição tecidual.

Um importante estudo demonstrou que CD86 liga-se preferencialmente a molécula CD28, gerando uma resposta pró-inflamatória, enquanto CD80 à CTLA-4, o que levaria a uma resposta imunomoduladora (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004). Além disso, Marrof e colaboradores (2009) demonstraram que CD86, e não CD80 está, envolvido na proliferação de células T CD8⁺ em modelos de leishmaniose visceral causado por infecção por *L. donovani* (Marroof, Beattie et al. 2009).

Outra molécula analisada foi HLA-DR, uma das moléculas da família do MHC-II. Esse receptor é a principal molécula apresentadora de antígenos em macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B. As moléculas HLA-DR estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos CD4⁺, que quando ativadas, secretam citocinas e desempenham importante papel na imunidade adquirida. O HLA-DR também pode participar na patogenia de doenças ao selecionarem qual peptídeo antigênico será

apresentado ao linfócito T. Por exemplo, o antígeno HLA-B53 protege contra as formas graves de malária por apresentar um peptídeo imunodominante do parasita aos linfócitos (Cserti-Gazdewich, Mayr et al.). Na leishmaniose, trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a importância desse receptor tanto em células da imunidade inata, quanto em linfócitos T (Bottrel, Dutra et al. 2001; Antonelli, Dutra et al. 2004; Antonelli, Dutra et al. 2005; Gollob, Antonelli et al. 2005; Gaze, Dutra et al. 2006; Faria, Souza et al. 2009).

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que a IMF do HLA-DR não apresentou diferenças entre os tratamentos, apenas nas células CD14⁺CD16⁻ infectadas *in vitro* por *L. braziliensis* e tratadas com DT.15 por 48 horas, em que se observou redução na IMF desse marcador. No entanto, os resultados que mais chamaram a atenção, mais uma vez, foram as diferenças nos perfis de expressão dessa molécula, especialmente quando se compararam as células infectadas *in vitro* por *L. braziliensis* em relação as demais espécies de *Leishmania* (Figura 41). Devido a grande importância desse receptor, sugerimos que sua redução induzida por DT.15 nos monócitos poderia prejudicar a resposta de células T, uma vez que a apresentação de antígenos é fundamental para a geração do primeiro sinal de ativação e diferenciação dessas células. Freitas-Teixeira e colaboradores (2011), demonstraram que as células do sistema imunológico de pacientes com leishmaniose cutânea difusa classificados de acordo com seu estado clínico/laboratorial (número de lesões, dias de duração da doença e positividade na reação intradérmica de Montenegro), apresentaram aumento da capacidade leishmanicida, com um perfil imunofenotípico misto composto por células da imunidade inata e adaptativa (Freitas-Teixeira, Silveira-Lemos et al. 2012). Embora a diminuição da resposta de células T possa ser, aparentemente, contraditória em relação ao uso de um tratamento eficaz, devemos lembrar que: (1) as células T não são as principais células responsáveis pela eliminação do parasito; (2) a eliminação excessivamente rápida e cura estéril são prejudiciais para geração de resposta protetora de memória (Gollob, Antonelli et al. 2005); (3) o controle da resposta de células T pode ser importante para evitar a destruição tecidual subsequente, uma vez que essas células são críticas no desenvolvimento também de patologia.

Outra avaliação realizada foi com relação a produção de citocinas. A primeira citocina avaliada foi a TNF. Essa citocina é produzida por neutrófilos, macrófagos, monócitos e células T, e seus níveis na corrente sanguínea variam por uma série de fatores, como infecções, traumas, injúria térmica e alguns tumores. O TNF, entre outras funções, é responsável por induzir disfunção endotelial, com aumento da permeabilidade

vascular, além de ativar células de imunidade adaptativa e inata. Os resultados obtidos nessa tese demonstraram que o tratamento com DT.15 reduziu a expressão dessa citocina em células infectadas com *L. braziliensis* e *L. major* no tempo de 48 horas. Quando se avaliou uma concentração 3 vezes maior de drogas, observou-se aumento da expressão dessa citocina em células infectadas *in vitro* por *L. braziliensis* e tratadas com Glucantime®, por 24 horas. Ambos os subtipos de monócitos avaliados e infectados por *L. infantum* também apresentaram aumento na expressão de TNF após tratamento com Glucantime®. Mais uma vez, as espécies de *Leishmania*, principalmente *L. braziliensis* e *L. major*, apresentaram diferenças na expressão de TNF (Figura 42 e 43).

Trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram a importância das citocinas no controle da leishmaniose (Bottrel, Dutra et al. 2001; Lessa, Machado et al. 2001; Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003; Antonelli, Dutra et al. 2004; Antonelli, Dutra et al. 2005; Faria, Gollob et al. 2005; Gaze, Dutra et al. 2006; Carvalho, Passos et al. 2007). Desta forma, o papel do TNF e sua importância na morte do parasito pelo hospedeiro foi bem estabelecida. No entanto, poucos são os trabalhos que avaliam a expressão de TNF, assim como de outras citocinas, após tratamento com as drogas de ação leishmanicida. O presente estudo demonstrou que o tratamento com DT.15 apresentou baixa expressão dessa citocina em duas espécies de *Leishmania* e após 48 horas de cultura.

O TNF apresenta um importante papel na leishmaniose, favorecendo a ativação celular e morte do parasito. No entanto, estudos realizados com pentoxifilina apresentaram efeitos benéficos desse medicamento na leishmaniose humana (Machado, Lessa et al. 2007; Ribeiro de Jesus, Luna et al. 2008; Machado, Carvalho et al. 2011). Esse medicamento inibe a degradação de AMP cíclico que, com o aumento da concentração intracelular, regula negativamente o NF- κ B e NF-AT, inibindo a transcrição e suprimindo a produção, conseqüentemente, de TNF. Esse tratamento apresentou resultados benéficos, já sendo utilizado em estudos com humanos infectados por *L. braziliensis* (Ribeiro de Jesus, Luna et al. 2008). Assim, a droga teste DT.15 também reduziu a expressão dessa citocina, apresentando, mais uma vez, característica favoráveis para sua utilização como droga leishmanicida.

Com relação a expressão de IL-6, encontraram-se alterações no tempo de 48 horas. Nas células infectadas por *L. infantum*, observou-se aumento na expressão dessa citocina após tratamento com anfotericina B (em ambos os subtipos celulares), e com DT.15 nas células CD14⁺CD16⁻. No entanto, DT.15 reduziu a expressão de IL-6 após 48 horas de cultura, e em células infectadas *in vitro* por *L. major*. Este resultado foi obtido avaliando uma maior concentração de DT.15. O tratamento com Glucantime® (300µg/ml)

e DT.15 (9 μ M) aumentaram a expressão de IL-16 nos monócitos infectados *in vitro* por *L.infantum*.

A citocina IL-12 é produzida, principalmente, por células dendríticas e macrófagos. Durante a avaliação da expressão desta citocina, observou-se que células CD14⁺CD16⁺ infectadas por *L.major* e tratadas com anfotericina aumentaram a expressão dessa citocina no tempo de 24 horas. Não se encontraram outras diferenças entre os tratamentos nas outras espécies e concentrações da droga. No entanto, na descrição dos dados, observou-se que as células infectadas por *L. braziliensis* apresentaram uma maior quantidade de células que expressão IL-12 em relação as demais espécies. Além disso, as células infectadas *in vitro* por *L.infantum* produzem mais IL-12 no tempo de 48 horas.

Na avaliação da expressão de IL-10, não se encontraram diferenças entre os tratamentos realizados nas diferentes concentrações e tempos de cultura. O perfil de expressão desta citocina também foi semelhante entre as espécies. A IL-10 é uma importante citocina imunomoduladora na leishmaniose. Trabalhos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o aumento dessa citocina ocorre concomitantemente com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, tanto em monócitos, quanto em linfócitos (Bottrel, Dutra et al. 2001; Antonelli, Dutra et al. 2004; Antonelli, Dutra et al. 2005; Faria, Gollob et al. 2005; Gollob, Antonelli et al. 2005; Gaze, Dutra et al. 2006; Keesen, Antonelli et al. 2011). No entanto, os tratamentos com as drogas não promoveram alterações na expressão de IL-10 nos subtipos de monócitos avaliados.

Todos esses resultados indicam que, de forma geral DT.15 inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 nas células infectadas pelas espécies de *L. braziliensis* e *L. major*, e levou a aumento na expressão de IL-6 nas células infectadas por *L. major*. As drogas de tratamento padrão (anfotericina B e Glucantime®), no entanto, aumentaram a expressão dos marcadores pró-inflamatórios nessas células, tendo uma variação entre as espécies infectantes. Os resultados também demonstraram que essas mesmas drogas aumentaram a morte celular, e um dos mecanismos que pode contribuir para aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias é a apoptose e morte celular. Desta forma, sugerimos que a droga teste DT.15 apresenta importante ação leishmanicida e baixa toxicidade, o que justificaria a continuidade dos estudos com essa naftoquinona.

A N-acetilcisteína (NAC) também foi avaliada neste estudo. Como foi apresentado na revisão da literatura desta tese, a NAC é um tiol, que apresenta funções mucolíticas, além de ser o precursor da L-cisteína e glutathione reduzida. A NAC é uma fonte de grupamentos sulfidrilas nas células e atua como removedora “scavenger” de radicais

livres, seja interagindo com ROS, como o radical hidroxila (OH·) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ou em RNS, atuando no NO (Kelly 1998).

Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo demonstraram ação leishmanicida desse composto em camundongos infectados por *L. major* e tratados via oral com NAC (Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003). Além disso, diversos outros estudos demonstraram a ação desse composto em modelos animais para leishmaniose, bem como em células humanas infectadas, e outras doenças infecciosas causadas por protozoários, como a malária (Carter, Hutchison et al. 2006; Romão, Tovar et al. 2006; Cruz, Fonseca et al. 2008; Monteiro, Marques et al. 2008; Charunwatthana, Abul Faiz et al. 2009).

Inicialmente, será discutida a ação direta da NAC e da droga de tratamento padrão Glucantime® nas culturas de *L. braziliensis* e *L. major*. Ainda levando em consideração os efeitos de NAC, esse composto foi avaliado tanto na sua ação direta, em diferentes concentrações, quanto associado ao Glucantime® na concentração de 5mM. Como já caracterizamos o comportamento das espécies de *Leishmania* após o tratamento com anfotericina B, nessa etapa dos resultados, avaliamos como seria o comportamento desses parasitos após o tratamento com Glucantime®, associado ou não a NAC.

Assim como foi realizado na avaliação da atividade leishmanicida da droga DT.15, realizou-se os ensaios de contagem dos parasitos em câmara de Neubauer e diluição limitante. Observou-se que ambos os ensaios apresentaram resultados semelhantes. Desta forma, o tratamento com Glucantime®, associado ou não a 5mM de NAC, bem como as diferentes concentrações da NAC, reduziram o número de parasitos em ambas as espécies estudadas e nos dois tempos de cultura (Figura 51 e 52). No entanto, ressalta-se que o tratamento apenas com NAC nas diferentes concentrações (2,5, 5, 10 e 20 mM) apresentou resultados mais evidentes que o tratamento com Glucantime®, associado ou não a NAC.

Sabe-se que a *Leishmania* apresenta mecanismos de proteção contra a ação de radicais livres, como o sistema de glutatona e tripanotona/tripantona redutase. Esses sistemas atuam principalmente, contra os efeitos tóxicos de espécies reativas derivadas de nitrogênio (RNS), sendo este o principal mecanismo de ação das células hospedeiras infectadas pelo parasito. No entanto, o que se observa nos resultados apresentados nessa tese foi que a cultura com um importante precursor da glutatona redutase em células de mamíferos, a NAC, apresentou características leishmanicidas quando em cultura com os parasitos. Devido à acidez desse composto, torna-se importante salientar que em todos os ensaios realizados, o pH do meio de cultura para crescimento dos parasitos foi o mesmo (meio Schneider's a 6,7), sendo esse pH mantido após a adição

das drogas avaliadas. Assim, alterações no pH das soluções, mesmo com a adição dos compostos avaliados, não justificariam a morte celular. A *Leishmania* apresenta um mecanismo redox composto por três enzimas: tripanotona redutase, triparedoxina e triparedoxina peroxidase, cuja função é proteger contra danos oxidativos. A NAC é a principal molécula precursora da glutathiona, assim, sugerimos que alterações no sistema redox da *Leishmania* induzida pela NAC podem ser um dos responsáveis pelos resultados observados.

No entanto, a contagem em câmara de Neubauer e o ensaio de diluição limitante indicam o número de parasitos após os tratamentos, não indicando se houve inibição na proliferação ou morte das *Leishmanias*. Para responder a essas questões, os parasitos foram marcados para anexina V e PI. Como se observou nos resultados apresentados, o tratamento com Glucantime® induziu a morte da espécie de *L. braziliensis* quando comparado ao controle meio, e em ambas concentrações da droga e tempos de cultura (Figura 54). No entanto, quando essa droga encontrava-se associada a NAC, não se observou esse efeito. Assim, a presença da NAC inibiu a morte do parasito quando associado ao medicamento Glucantime®. Na avaliação da espécie *L. major*, não foi observado morte celular após o tratamento com Glucantime®, associado ou não a NAC, quando comparado ao controle meio (Figura 54).

Sabe-se que o Glucantime® apresenta efeito leishmanicida, principalmente, nas formas amastigotas do parasito. No entanto, nas formas promastigotas da espécie de *L. braziliensis* apresentaram morte celular induzida por esse medicamento. Esses resultados não ocorreu com as culturas de *L. major*. Assim, pode-se sugerir que a adição de NAC ao tratamento com Glucantime®, nas culturas de *L. braziliensis*, apresentou um efeito protetor.

Quando se avaliaram as culturas de parasitos tratados com diferentes concentrações da NAC, demonstrou-se que o tratamento com NAC, em todas as concentrações testadas e em ambas as espécies avaliadas, apresentou taxa de morte superior ao controle meio (Figura 56). Desta forma, o tratamento com NAC foi capaz de induzir a morte desses parasitos, o que não foi observado quando associado a Glucantime®. Romão e colaboradores (2006) demonstraram em diversas espécies de *Leishmania* que as concentrações intracelulares de glutathiona foram diferentes. As espécies que apresentaram menores concentrações de glutathiona foram *L. braziliensis*, em seguida de *L. major* (Romao, Tovar et al. 2006). Estes autores demonstraram que, quanto maior a concentração de glutathiona na espécie de *Leishmania* avaliada, maior a

resistência a componentes tóxicos, como NO. Assim, a espécie mais susceptível aos efeitos tóxicos seria a *L. braziliensis* seguida de *L. major* (Romao, Tovar et al. 2006).

No entanto, o composto que induziu a morte nas culturas de *Leishmania* foi a NAC, principal precursora da glutathiona. Assim, a NAC pode, de alguma forma interferir no sistema redox do parasito, induzindo a sua morte. Para responder qual o mecanismo que gerou essa maior susceptibilidade do parasito a morte induzida pela NAC, seriam necessárias outras técnicas experimentais, como a medida da glutathiona intracelular nos parasitos, identificação das enzimas pertencentes ao sistema redox e seu comportamento após a cultura com NAC, por exemplo. Durante a pesquisa bibliográfica dessa tese, não foram encontrados outros estudos com o delineamento experimental semelhante ao nosso.

Dando continuidade a discussão desta tese, avaliou-se, em seguida, a ação da NAC associada ou não aos tratamentos padrões (anfotericina B e Glucantime®) em monócitos provenientes de CMSP de indivíduos saudáveis infectados, *in vitro*, pelas espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*.

O primeiro ensaio experimental realizado foi a avaliação da morte celular dos monócitos, infectados *in vitro* ou não, e tratados com as diferentes drogas (Figura 58). Como se observou, mais uma vez, a infecção com o parasito, independentemente da espécie infectante, foi capaz de induzir a morte nesses monócitos. Quando se avaliou o efeito citotóxico das drogas nos monócitos não infectados, notou-se que todos os tratamentos, associados a NAC ou não, apresentaram elevadas taxas de morte no tempo de 48 horas. O tratamento com Glucantime®, por sua vez, também foi tóxico no tempo de 24 horas, independentemente da presença da NAC (Figura 58). O Glucantime® inibe a ação de enzimas da glicólise e outras vias metabólicas. No entanto, a ação desse medicamento não é específica apenas no parasito, podendo ser tóxico as células do hospedeiro também (Teixeira, de Almeida et al. 2001).

Com relação aos monócitos infectados *in vitro* pelas diferentes espécies de *Leishmania*, observou-se que, nas células infectadas por *L. braziliensis*, o tratamento com Glucantime® associado a NAC apresentou elevada taxa de morte. No entanto, o tratamento com anfotericina B associado a NAC reduziu a morte no tempo de 48 horas. Já para as células infectadas *in vitro* por *L. infantum*, principalmente após o tratamento com anfotericina B, nos dois tempos de cultura, houve uma elevada taxa de morte nestas células. De forma bastante interessante, nos monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, o tratamento com Glucantime® foi o principal responsável pelas elevadas taxas de mortes

observadas. Esses resultados mantiveram-se nos experimentos que utilizaram uma concentração 3 vezes maior de drogas (Figuras 58 e 59).

Estes resultados indicaram que a associação da NAC com os tratamentos padrões não promoveram alterações quando se compara com os efeitos obtidos apenas com os tratamentos convencionais. Charunwatthana e colaboradores (2009), demonstraram em pacientes com malária, que o tratamento oral com NAC reduziu a parasitemia nesses pacientes, no entanto, não foram observados efeitos benéficos do uso de altas doses de NAC como tratamento adjuvante nos pacientes com malária grave (Charunwatthana, Abul Faiz et al. 2009). Outro estudo, realizado em camundongos, no entanto, demonstrou que a resistência ao medicamento estiboglucomato de sódio estava associado a manipulação dos níveis de glutathione, tanto pelo parasito, como pelo hospedeiro (Carter, Hutchison et al. 2006). Desta forma, o efeito leishmanicida proeminente encontrado nas culturas de parasito tratados isoladamente não foram observados nos modelos de infecção *in vitro* dos monócitos, podendo ser justificado pelo mecanismo redox presente no parasito e nas células hospedeira após a infecção.

Experimentos pilotos com diferentes concentrações da NAC foram realizados para determinar qual a concentração mais adequada para o nosso modelo. A utilização de 5mM mostrou-se a mais interessante, evitando-se concentrações superiores a 20mM que apresentaram alta citotoxicidade às células. Nosso grupo já utilizava essa concentração da NAC, e experimentos, *in vitro*, utilizando células de pacientes com LC infectados por *L. braziliensis*, demonstraram aumento de células T CD4 e CD8 que expressavam CD69, de monócitos CD14⁺CD86⁺, e redução de monócitos CD14⁺CD11b⁺ após estímulo com SLA e tratamento com 5mM de NAC (Vianna, Antonelli et al.). Uma limitação do nosso estudo foi a ausência da quantificação dos níveis de glutathione intracelular, o que ajudaria a compreender melhor os resultados encontrados. Além disso, o nosso trabalho avaliou o papel isolado e em conjunto da NAC com drogas convencionais em modelos *in vitro*. Não encontramos estudos com delineamento experimental semelhantes ao nosso.

Para avaliar a infectividade *in vitro* das diferentes espécies de *Leishmania* nos monócitos, os parasitos foram corados com CFSE. Os resultados demonstrados indicaram que não houve diferenças na taxa de infecção dessas células pelas diferentes espécies (Figura 60). No entanto, quando se avaliou a IMF desse marcador, observou-se que, nos monócitos infectados por *L. braziliensis*, o tratamento apenas com NAC, associado ou não a anfotericina B (3µM), no tempo de 48 horas, reduziu a IMF desse marcador (Figura 61). Já nas células infectadas *in vitro* por *L. major*, notou-se que o tratamento com NAC, no tempo de 48 horas, apresentou uma maior IMF, assim como o

tratamento com Glucantime®, no tempo de cultura de 24 horas. Ainda avaliando estas células, o tratamento com anfotericina B associado a NAC reduziu a IMF após 48 horas de cultura (Figura 61).

Hipotetizamos que a redução na IMF para CFSE poderia indicar a morte celular do parasito no interior dos monócitos. No entanto, nas células não se observou isso, uma vez que no tempo de cultura de 48 horas, independentemente do tratamento, apresentou uma maior IMF para CFSE quando comparado ao tempo de 24 horas. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados para o tratamento com a droga DT.15, e assim como foi justificado para essa droga, sugerimos que a redução da IMF no tempo de 24 horas ocorreu devido a replicação do parasito e sua liberação no meio de cultura. Assim, no tempo de 24 horas, não tenha sido possível reinfectar novas células, o que pode ter ocorrido no tempo de 48 horas.

Com o intuito de caracterizar melhor o efeito das drogas padrões, associadas ou não a NAC (5mM), ensaios de imunofenotipagem para marcadores de ativação e citocinas foram feitos. Como demonstrados nos resultados dessa tese, os marcadores de ativação avaliados foram CD11b, CD80, CD86 e HLA-DR; bem como as citocinas TNF, IL-6, IL-12 e IL-10.

A molécula CD11b, uma integrina, responsável pela ativação e ligação dos monócitos ao endotélio vascular para posterior diapedese, dentre outras funções, foi a primeira molécula avaliada. Como se observou na figura 62 e 63, o tratamento com NAC não induziu alterações na expressão desse marcador quando associada as drogas padrões. No entanto, nas células infectadas *in vitro* por *L. braziliensis* e tratadas com 5mM de NAC, observou-se redução na expressão desse receptor nas células CD14⁺CD16⁻. Quando se utilizou uma concentração maior das drogas, as células infectadas por *L. infantum* e tratadas com anfotericina B aumentaram a expressão do CD11b, enquanto os monócitos infectados *in vitro* por *L. major* aumentaram a expressão desse marcador após tratamento com Glucantime® (Figura 63). Mais uma vez, o perfil de expressão desse receptor varia de acordo com a espécie infectante, e apresentou uma cinética de expressão de acordo com o tempo.

Pinheiro e colaboradores (2006) demonstraram, em modelos animais, que as células que expressão CD11b^{hi} são mais fagocíticas e permissivas à infecção por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Pinheiro, Hermida et al. 2006). Assim, observamos que as células infectadas por *L. braziliensis* apresentam alta expressão de CD11b no tempo de 24 horas, reduzindo no tempo de 48 horas. Nas células infectadas por *L. major* observou-se justamente o oposto. Essa observação foi independente do tratamento. Estudo

realizado *in vitro* com células humanas do sangue total demonstraram que a NAC, em uma concentração menor que 10mM, reduziu a expressão de CD11b sob estímulo com LPS (Nandate, Ogata et al. 2005). No entanto, apenas nas células CD14⁺CD16⁻ infectadas por *L. braziliensis*, e tratadas com NAC, observaram-se redução na expressão de CD11b. Assim, não se pode confirmar se a alteração na expressão desse receptor predispôs a uma maior infectividade, ou se NAC, por reduzir a expressão desse receptor, protegeria contra infecções futuras. No entanto, Vianna e colaboradores (dados não publicados), demonstraram em monócitos de pacientes com LC, tratados *in vitro* com 5mM de NAC, que houve redução na expressão desse marcador, o que no contexto da leishmaniose pode ser um ponto positivo (Vianna, Antonelli et al.).

Como descrito anteriormente, os receptores CD80 e CD86 são importantes marcadores de ativação por atuarem em receptores de células T (CD28 e CTLA-4), exercendo papéis distintos na regulação imune. O que se observou nos resultados demonstrados nesta tese foi que o tratamento associado de NAC e drogas padrões mantiveram a expressão de CD80 semelhante ao controle nas células infectadas *in vitro* por *L. infantum* (Figura 64). Além disso, nos monócitos infectados por *L. major*, o tratamento com Glucantime® associado a NAC aumentou a expressão desse marcador em ambos os tipos celulares de monócitos avaliados. Quando se avaliou a expressão do CD80 na presença de uma quantidade maior de drogas, notou-se que o tratamento associado de anfotericina B e NAC elevou a expressão de CD80 nas células infectadas *in vitro* por *L. braziliensis*. Mais uma vez, o tratamento associado de NAC com anfotericina B e Glucantime® manteve a expressão desse marcador semelhante ao controle meio nos monócitos infectados por *L. infantum*. Assim como o tratamento com Glucantime® elevou a expressão desse marcador nas células CD14⁺CD16⁺ infectadas *in vitro* por *L. major* (Figura 65).

A expressão de CD86 em monócitos CD14⁺CD16⁻ infectados *in vitro* por *L. braziliensis* e tratados com as drogas padrões associadas a NAC reduziu (Figura 66 e 67). Assim, como ocorreu na avaliação da expressão da molécula CD80, as células infectadas por *L. infantum* e tratadas com as drogas padrões associadas a NAC mantiveram a expressão desse receptor semelhante ao controle meio. As células tratadas com anfotericina B e infectadas por *L. major*, apresentaram alta expressão de CD86, no entanto, o tratamento com NAC, associado ou não a anfotericina B, reduziu a expressão desse marcador. Em ambas as moléculas avaliadas, observou-se que o tratamento com NAC, isoladamente, reduziu a expressão de CD80 e CD86 nas células infectadas por *L. major*. Os estudos que avaliaram o efeito da NAC na leishmaniose foram, em sua maioria,

realizados em modelos animais e não realizaram imunofenotipagem para marcadores de ativação e citocinas.

Um estudo demonstrou que, no transplante de células tronco alogênicas, a NAC foi capaz de induzir aumento na expressão de CD80, CD86 e CD83 em células dendríticas maduras, no entanto, esse composto imunomodulou a ação de células T nessa doença (Karlsson, Nava et al. 2011). Nesse contexto, observou-se que NAC reduziu a expressão dos marcadores de ativação, associado ou não a anfotericina B nas células infectadas por *L. braziliensis*, e aumentou nas células infectadas por *L. major* e tratadas em conjunto com Glucantime®. Mais uma vez, observa-se o efeito paradoxal desempenhado por essa molécula, com resultados distintos de acordo com a doença estudada, modelo de estudo utilizado e forma de administração do composto. *In vivo*, a administração oral de NAC, em modelos animais, induziu uma melhor resposta do sistema imune contra a leishmaniose (Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003; Cruz, Fonseca et al. 2008)

Na avaliação da IMF do marcador HLA-DR, assim como observado para a expressão das moléculas CD80 e CD86, as células infectadas por *L. major* e tratadas apenas com NAC reduziram a IMF do HLA-DR no tempo de 24 horas (Figura 68). Verhasselt e colaboradores (1999), demonstraram que, células dendríticas humana ativadas por LPS e tratadas com NAC, *in vitro*, apresentaram baixa expressão de HLA-DR, CD86 e CD40, não alterando a expressão de CD80. Além disso, os efeitos da NAC nas células dendríticas são independentes da quantidade de glutathiona intracelular (Verhasselt, Vanden Berghe et al. 1999).

Mais uma vez, observa-se que a NAC apresenta efeitos contraditórios, variando sua ação de acordo com a doença estudada. Na leishmaniose, a resposta pró-inflamatória do tipo Th1 é a principal responsável pela morte do parasito e cura da doença. Além disso, cabe salientar que o tratamento com NAC, isoladamente, afetou a expressão de moléculas de ativação, principalmente, nas células infectadas por *L. major*.

As citocinas apresentam um papel importante na patogênese da leishmaniose. Os resultados apresentados demonstraram que, para as células infectadas *in vitro* com *L. braziliensis*, o tratamento com Glucantime® aumentou a expressão de TNF, e, quando associado a NAC, a citocina que apresentou aumento foi a IL-10. Na avaliação de morte das células infectadas por esta espécie, as células tratadas com Glucantime® associado a NAC, observou-se uma maior morte celular. O TNF inibe a apoptose de células infectadas por *Leishmania* (Getti, Cheke et al. 2008), e a produção de IL-10 auxilia na imunomodulação da resposta imune. Como a apoptose induz a ativação do sistema

imunológico, sugerimos que os resultados encontrados sejam devido a morte celular desses monócitos induzida após a infecção e tratamento.

Analisando as células infectadas *in vitro* por *L. infantum*, a citocina que mais apresentou alterações foi a IL-6 no tratamento com anfotericina B, associado ou não com NAC, e após o tratamento com Glucantime®. Com relação a produção de IL-10 por essas células, enquanto o tratamento com anfotericina B associado a NAC levou a aumento na produção, o contrário foi observado nas células tratadas com Glucantime® associada a NAC.

De forma bastante interessante, os monócitos infectados *in vitro* por *L. major*, apresentaram aumento na expressão de TNF, IL-6, IL-12 e IL-10 quando tratadas com Glucantime® (300µg/ml) associado a NAC.

Assim, o tratamento com NAC como adjuvante não promoveu alterações tão expressivas como nas culturas com os parasitos. No entanto, diferentemente do que foi observado no tratamento com DT.15, NAC alterou a expressão de IL-10 nas espécies de *Leishmania*, reduzindo também a expressão de marcadores de ativação. A resposta predominantemente próinflamatória, com produção de moléculas tóxicas como NO, e de citocinas como IFN-γ e TNF, favorece a resolução da doença, com a morte do parasito. Apesar desse cenário, a produção de IL-10 ocorre concomitantemente com a produção dessas citocinas, e é fundamental para garantir o controle da resposta imune, evitando a exarcebação da mesma. Outro ponto importante é que este estudo foi realizado *in vitro* e que outros estudos realizados *in vivo*, principalmente com camundongos, demonstraram que a administração de NAC apresentou efeitos benéficos no curso da leishmaniose (Rocha-Vieira, Ferreira et al. 2003; Cruz, Fonseca et al. 2008; Monteiro, Marques et al. 2008). Como não foi encontrado estudos com um delineamento experimental semelhante aos realizados nesta tese, torna-se difícil saber como essas alterações podem influenciar no tratamento dos indivíduos infectados.

Neste contexto, e devidos os seus efeitos paradoxais, acreditamos que a continuidade dos estudos com NAC devam ser realizados, com o intuito de elucidar mecanismos de ação, além de avaliar seus efeitos em modelos *in vivo*. Tal sugestão também se aplica para a droga teste DT.15. Uma vez que ambos compostos apresentaram interessantes resultados com relação ao seu efeito leishmanicida.

7.0 – CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que indivíduos infectados por *L. braziliensis* apresentaram redução na expressão de moléculas co-estimuladoras, o que sugeri uma resposta imune deficiente no controle do parasito. Apesar desse prejuízo, mecanismos compensatórios, como maior expressão de CD16, TNF e TLR9 foram desencadeados pelos monócitos circulantes do hospedeiro, na tentativa de resolução da doença. Essas informações auxiliam a elucidar as funções dos monócitos periféricos durante a leishmaniose, uma vez que a expressão de TLR9 correlacionou-se com o parâmetro clínico de área da lesão. Além disso, na avaliação dos candidatos terapêuticos com ação leishmanicida nas culturas isoladas das diferentes espécies de *Leishmania*, bem como no modelo de infecções *in vitro* de monócitos humanos, demonstrou-se que as drogas DT.15 e NAC apresentaram efeitos leishmanicida e baixa citotoxicidade celular. Observou-se ainda que as diferentes espécies de *Leishmania* comportaram-se de formas distintas aos tratamentos convencionais e alternativos, apresentando diferentes perfis de marcação para moléculas de ativação e citocinas, sugerindo que a fisiopatologia da leishmaniose é distinta de acordo com a espécie infectante e o quadro clínico do paciente.

8.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou Fakher, F. H., N. Rachinel, et al. (2009). "TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions." *J Immunol* **182**(3): 1386-96.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice." *C R Biol* **327**(6): 581-9.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **4**(7): 499-511.
- Ali, A., A. N. Assimopoulou, et al. (2011). "Structure/antileishmanial activity relationship study of naphthoquinones and dependency of the mode of action on the substitution patterns." *Planta Med* **77**(18): 2003-12.
- Almeida, R. P., J. Brito, et al. (2005). "Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials." *Am J Trop Med Hyg* **73**(1): 79-81.
- Aluigi, M. G., S. De Flora, et al. (2000). "Antiapoptotic and antigenotoxic effects of N-acetylcysteine in human cells of endothelial origin." *Anticancer Res* **20**(5A): 3183-7.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. (2005). "Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis." *Immunol Lett* **101**(2): 226-30.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. (2004). "Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation." *Clin Exp Immunol* **136**(2): 341-8.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. (2006). "Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis." *Infect Immun* **74**(11): 6317-23.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." *Free Radic Biol Med* **6**(6): 593-7.
- Atkuri, K. R., J. J. Mantovani, et al. (2007). "N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency." *Curr Opin Pharmacol* **7**(4): 355-9.
- Bacellar, O., H. Lessa, et al. (2002). "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." *Infect Immun* **70**(12): 6734-40.
- Bafica, A., H. C. Santiago, et al. (2006). "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection." *J Immunol* **177**(6): 3515-9.
- Barroso, P. A., J. D. Marco, et al. (2007). "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." *J Antimicrob Chemother* **59**(6): 1123-9.
- Benites, J., J. A. Valderrama, et al. (2008). "Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines." *Bioorg Med Chem* **16**(2): 862-8.
- Bhatia, S., M. Edidin, et al. (2005). "Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: implications for signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15569-74.
- Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages?" *Parasitol Today* **15**(1): 22-8.
- Bottrel, R. L., W. O. Dutra, et al. (2001). "Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis." *Infect Immun* **69**(5): 3232-9.

- Breithaupt, T. B., A. Vazquez, et al. (1996). "The suppression of T cell function and NF(kappa)B expression by serine protease inhibitors is blocked by N-acetylcysteine." Cell Immunol **173**(1): 124-30.
- Brown, J. A., R. G. Titus, et al. (1996). "Blockade of CD86 ameliorates Leishmania major infection by down-regulating the Th2 response." J Infect Dis **174**(6): 1303-8.
- Burgunder, J. M., A. Varriale, et al. (1989). "Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration." Eur J Clin Pharmacol **36**(2): 127-31.
- Cao, C., Y. Gao, et al. (2010). "The efficacy of activated protein C in murine endotoxemia is dependent on integrin CD11b." J Clin Invest **120**(6): 1971-80.
- Cao, C., D. A. Lawrence, et al. (2005). "A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics." Blood **106**(9): 3234-41.
- Carrada, G., C. Caneda, et al. (2007). "Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with Leishmania mexicana." Parasite Immunol **29**(3): 117-26.
- Carrera, L., R. T. Gazzinelli, et al. (1996). "Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice." J Exp Med **183**(2): 515-26.
- Carter, K. C., S. Hutchison, et al. (2006). "Resistance of Leishmania donovani to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase." Antimicrob Agents Chemother **50**(1): 88-95.
- Carvalho, L. P., S. Passos, et al. (2007). "Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis." Parasite Immunol **29**(5): 251-8.
- Carvalho, L. P., P. M. Petritus, et al. (2012). "Lymph Node Hypertrophy following Leishmania major Infection Is Dependent on TLR9." J Immunol **188**(3): 1394-401.
- Castro, R. (1972). "Tratamento da leishmaniose tegumentar pela anfotericina B – A propósito de 70 casos." Anais Brasileiros de Dermatologia **47**: 230-233.
- CDC, C. f. D. C. a. P.-. (2012). Retrieved July, 10, 2012, from <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/diagnosis.html>.
- Chang, K. P. and B. S. McGwire (2002). "Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence." Kinetoplastid Biol Dis **1**(1): 1.
- Charunwatthana, P., M. Abul Faiz, et al. (2009). "N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized, double-blinded placebo-controlled clinical trial." Crit Care Med **37**(2): 516-22.
- Coelho, T. S., R. S. Silva, et al. (2010). "Activity of beta-lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of Mycobacterium tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **90**(5): 293-7.
- Coutinho, S. G., M. P. Oliveira, et al. (1996). "T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified Leishmania pifanoi amastigote antigens and Leishmania braziliensis promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure." Exp Parasitol **84**(2): 144-55.
- Cruz, K. K., S. G. Fonseca, et al. (2008). "The influence of glutathione modulators on the course of Leishmania major infection in susceptible and resistant mice." Parasite Immunol **30**(3): 171-4.
- Cserti-Gazdewich, C. M., W. R. Mayr, et al. "Plasmodium falciparum malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV)." Vox Sang **100**(1): 99-111.
- Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." Exp Mol Pathol **72**(2): 132-41.

- Da-Cruz, A. M., R. Bittar, et al. (2002). "T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy." Clin Diagn Lab Immunol **9**(2): 251-6.
- da Cunha-Junior, E. F., W. Pacienza-Lima, et al. (2011). "Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis." J Antimicrob Chemother **66**(7): 1555-9.
- de Almeida, M. C., V. Vilhena, et al. (2003). "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(7): 861-70.
- De Caro, L., A. Ghizzi, et al. (1989). "Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers." Arzneimittelforschung **39**(3): 382-6.
- de Carvalho, L. P., M. Soto, et al. (2003). "Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens." Microbes Infect **5**(1): 7-12.
- de Oliveira Cardoso, F., S. de Souza Cda, et al. (2010). "Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice." J Infect Dis **201**(12): 1933-40.
- de Souza, G. F., J. K. Yokoyama-Yasunaka, et al. (2006). "Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis." Nitric Oxide **15**(3): 209-16.
- Denton, H., J. C. McGregor, et al. (2004). "Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1." Biochem J **381**(Pt 2): 405-12.
- Dinnen, R. D. and K. Ebisuzaki (1997). "The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product." Anticancer Res **17**(2A): 1027-33.
- Ephros, M., A. Bitnun, et al. (1999). "Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes." Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 278-82.
- Faria, D. R., K. J. Gollob, et al. (2005). "Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis." Infect Immun **73**(12): 7853-9.
- Faria, D. R., P. E. Souza, et al. (2009). "Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **31**(8): 432-9.
- Farina, C., D. Theil, et al. (2004). "Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines." Int Immunol **16**(6): 799-809.
- Favali, C., D. Costa, et al. (2005). "Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis." Microbes Infect **7**(1): 86-92.
- FIOCRUZ, F. O. C.-. (2010). Retrieved June, 25, 2010, from <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=355&sid=6>.
- Firdous, R., M. Yasinzai, et al. (2009). "Efficacy of glucantime in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis." Int J Dermatol **48**(7): 758-62.
- Franklin, B. S., P. Parroche, et al. (2009). "Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5789-94.
- Freitas-Teixeira, P. M., D. Silveira-Lemos, et al. (2012). "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.
- Gantt, K. R., T. L. Goldman, et al. (2001). "Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*." J Immunol **167**(2): 893-901.

- Gaze, S. T., W. O. Dutra, et al. (2006). "Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population." Scand J Immunol **63**(1): 70-8.
- Gazzinelli, R. T. and E. Y. Denkers (2006). "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism." Nat Rev Immunol **6**(12): 895-906.
- Getti, G. T., R. A. Cheke, et al. (2008). "Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites?" Parasitology **135**(12): 1391-9.
- Giustarini, D., A. Milzani, et al. (2003). "Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood." Clin Chim Acta **330**(1-2): 85-98.
- Gollob, K. J., L. R. Antonelli, et al. (2005). "Insights into CD4+ memory T cells following Leishmania infection." Trends Parasitol **21**(8): 347-50.
- Goncalves, R., E. R. Vieira, et al. (2005). "A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of L. chagasi to canine peritoneal macrophages." BMC Infect Dis **5**(1): 39.
- Goto, H. and J. A. Lindoso (2010). "Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Expert Rev Anti Infect Ther **8**(4): 419-33.
- Grogl, M., T. N. Thomason, et al. (1992). "Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease." Am J Trop Med Hyg **47**(1): 117-26.
- Hail, N., Jr., B. Z. Carter, et al. (2006). "Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys." Apoptosis **11**(6): 889-904.
- Halstead, S. B., S. Mahalingam, et al. (2010). "Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes." Lancet Infect Dis **10**(10): 712-22.
- Hepburn, N. C. (2003). "Cutaneous leishmaniasis: an overview." J Postgrad Med **49**(1): 50-4.
- Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-9.
- Higgins, C. A., T. Bell, et al. (2010). "Growth inhibitory activity of extracted material and isolated compounds from the fruits of Kigelia pinnata." Planta Med **76**(16): 1840-6.
- Horta, M. F., B. P. Mendes, et al. (2011). "Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis." J Parasitol Res **2012**: 203818.
- Issels, R. D., A. Nagele, et al. (1988). "Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine." Biochem Pharmacol **37**(5): 881-8.
- Jain, S., S. B. Chodiseti, et al. (2011). "CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation of resting B cells." PLoS One **6**(6): e20651.
- Karlsson, H., S. Nava, et al. (2011). "N-acetyl-L-cysteine increases acute graft-versus-host disease and promotes T-cell-mediated immunity in vitro." Eur J Immunol **41**(4): 1143-53.
- Kayser, O., A. F. Kiderlen, et al. (2001). "Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 288-92.
- Kayser, O., A. F. Kiderlen, et al. (2000). "In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones." Acta Trop **76**(2): 131-8.
- Keesen, T. S., L. R. Antonelli, et al. (2011). "CD4 T cells defined by their Vbeta T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis." Clin Exp Immunol **165**(3): 338-51.
- Kelly, G. S. (1998). "Clinical applications of N-acetylcysteine." Altern Med Rev **3**(2): 114-27.
- Kin, N. W. and V. M. Sanders (2007). "CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism." J Immunol **179**(3): 1516-23.

- Lacaz, C., L. Paiva, et al. (1959). "O tratamento da leishmaniose tegumentar americana com a anfotericina B (nota prévia)." *Revista Paulista de Medicina* **55**: 15-17.
- Lessa, H. A., P. Machado, et al. (2001). "Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony." *Am J Trop Med Hyg* **65**(2): 87-9.
- Liese, J., U. Schleicher, et al. (2007). "TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis." *Eur J Immunol* **37**(12): 3424-34.
- Lima, N. M., C. S. Correia, et al. (2004). "Antileishmanial activity of lapachol analogues." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**(7): 757-61.
- Linsley, P. S., J. L. Greene, et al. (1994). "Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors." *Immunity* **1**(9): 793-801.
- Lira, A. A., E. A. Sester, et al. (2008). "Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation." *AAPS PharmSciTech* **9**(1): 163-8.
- Lisieux, R., Jácome RP, Oliveira AB, Raslan D, Müller A, Wagner H (1998). "Análise de Naftoquinonas em extratos brutos de raízes de Zeyheria montana M. (Bolsa-de-Pastor)." *Química Nova* **22**: 175-177.
- Machado, P. R., A. M. Carvalho, et al. (2011). "Development of cutaneous leishmaniasis after leishmania skin test." *Case Report Med* **2011**: 631079.
- Machado, P. R., H. Lessa, et al. (2007). "Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis." *Clin Infect Dis* **44**(6): 788-93.
- Malerich, J. P., T. J. Maimone, et al. (2005). "Biomimetic synthesis of antimalarial naphthoquinones." *J Am Chem Soc* **127**(17): 6276-83.
- Marcato, L. G., A. P. Ferlini, et al. (2008). "The role of Toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens." *Oral Microbiol Immunol* **23**(5): 353-9.
- Maroof, A., L. Beattie, et al. (2009). "Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8+ T cells in the absence of their cognate peptide antigen." *J Immunol* **183**(11): 7095-103.
- Mattner, J., H. Schindler, et al. (2000). "Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*." *Eur J Immunol* **30**(8): 2257-67.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." *Nature* **449**(7164): 819-26.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1998). "Innate immune recognition and control of adaptive immune responses." *Semin Immunol* **10**(5): 351-3.
- Monteiro, M. C., F. C. Marques, et al. (2008). "N-acetyl-L-cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*." *Parasitol Res* **102**(4): 801-3.
- Mosser, D. M. (1990). "An assay to quantitate the binding of *Leishmania* amastigotes to macrophages." *J Immunol Methods* **130**(2): 235-42.
- Muller, K., G. van Zandbergen, et al. (2001). "Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice." *Med Microbiol Immunol* **190**(1-2): 73-6.
- Nandate, K., M. Ogata, et al. (2005). "N-acetyl-cysteine attenuates endotoxin-induced adhesion molecule expression in human whole blood." *Anesth Analg* **100**(5): 1453-7, table of contents.
- Nolan, A., H. Kobayashi, et al. (2009). "Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis." *PLoS One* **4**(8): e6600.

- Omara, F. O., B. R. Blakley, et al. (1997). "Immunomodulatory and protective effects of N-acetylcysteine in mitogen-activated murine splenocytes in vitro." Toxicology **116**(1-3): 219-26.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2005). "Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity." Adv Exp Med Biol **560**: 11-8.
- Pastor, A., P. S. Collado, et al. (1997). "Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine." J Hepatol **27**(2): 363-70.
- Pelissari DM, C. M., Sousa-Gomes ML, Lima Júnior FEF (2011). "Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil." Epidemiologia do Serviço de Saúde **20**(1): 107-110.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, et al. (2004). "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." Immunity **21**(3): 401-13.
- Pereira, L. I., M. L. Dorta, et al. (2009). "Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens." Am J Trop Med Hyg **81**(3): 378-83.
- Peters, N. C., J. G. Egen, et al. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-4.
- Pinheiro, N. F., Jr., M. D. Hermida, et al. (2006). "Leishmania infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes." Infect Immun **74**(7): 3912-21.
- Proudfoot, L., A. V. Nikolaev, et al. (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10984-9.
- Ribeiro-Gomes, F. L., N. C. Peters, et al. (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response." PLoS Pathog **8**(2): e1002536.
- Ribeiro de Jesus, A., T. Luna, et al. (2008). "Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in Leishmania and HTLV-I infections." Int Immunopharmacol **8**(10): 1344-53.
- Rocha-Vieira, E., E. Ferreira, et al. (2003). "Histopathological outcome of Leishmania major-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine." Immunology **108**(3): 401-8.
- Rogers, M. E., T. Ilg, et al. (2004). "Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG." Nature **430**(6998): 463-7.
- Romao, P. R., J. Tovar, et al. (2006). "Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of Leishmania spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity." Braz J Med Biol Res **39**(3): 355-63.
- Sacks, D. and A. Sher (2002). "Evasion of innate immunity by parasitic protozoa." Nat Immunol **3**(11): 1041-7.
- Sampaio, R. N., G. H. Takano, et al. (2003). "[In vivo Terbinafine inefficacy on cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis in C57BL/6 mice]." Rev Soc Bras Med Trop **36**(4): 531-3.
- Sampaio, S. A., J. T. Godoy, et al. (1960). "The treatment of American (mucocutaneous) leishmaniasis with amphotericin B." Arch Dermatol **82**: 627-35.
- Santos, D. O., C. E. Coutinho, et al. (2008). "Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review." Parasitol Res **103**(1): 1-10.
- Saúde, M. d. (2012). "Ministério da Saúde." Retrieved July, 20, 2012, from <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>.

- Schleicher, U., J. Liese, et al. (2007). "NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs." J Exp Med **204**(4): 893-906.
- Serbina, N. V., C. Shi, et al. (2012). "Monocyte-mediated immune defense against murine *Listeria monocytogenes* infection." Adv Immunol **113**: 119-34.
- Sereno, D., M. Cavaleyra, et al. (1998). "Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3097-102.
- Sereno, D. and J. L. Lemesre (1997). "Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents." Antimicrob Agents Chemother **41**(5): 972-6.
- Silva, M. G. d. (2012). SÍNTESE DE DERIVADOS 2,3-DIINO-1,4-NAFTOQUINONAS USANDO A REAÇÃO DE SONOGASHIRA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA. Programa de Pós-Graduação em Química. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. **master**: 143.
- Silva, T., A. Reis, et al. "Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos " Boletim de Biotecnologia: 32-40.
- Soares, G., A. Barral, et al. (2006). "CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data." J Leukoc Biol **79**(1): 36-9.
- Stolpen, A. H., J. S. Pober, et al. (1988). "Class I major histocompatibility complex proteins diffuse isotropically on immune interferon-activated endothelial cells despite anisotropic cell shape and cytoskeletal organization: application of fluorescence photobleaching recovery with an elliptical beam." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(6): 1844-8.
- Strauss-Ayali, D., S. M. Conrad, et al. (2007). "Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection." J Leukoc Biol **82**(2): 244-52.
- Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.
- Teixeira, M. J., Y. M. de Almeida, et al. (2001). "In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol)." Phytother Res **15**(1): 44-8.
- Tirouvanziam, R., C. K. Conrad, et al. (2006). "High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4628-33.
- Tuon, F. F., V. S. Amato, et al. (2008). "Toll-like receptors and leishmaniasis." Infect Immun **76**(3): 866-72.
- Tuon, F. F., E. R. Fernandes, et al. (2010). "The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in the epidermis of patients with cutaneous leishmaniasis." J Dermatol Sci **59**(1): 55-7.
- Tuon, F. F., E. R. Fernandes, et al. (2010). "The expression of TLR9 in human cutaneous leishmaniasis is associated with granuloma." Parasite Immunol **32**(11-12): 769-72.
- van Zandbergen, G., A. Bollinger, et al. (2006). "Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13837-42.
- Verhasselt, V., W. Vanden Berghe, et al. (1999). "N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition." J Immunol **162**(5): 2569-74.
- Vianna, P., L. Antonelli, et al. Immunoregulation of Accessory and Effectors Cellular Functions in Human Leishmaniasis: Modulation of Intracellular Glutathione Content. unpublished.
- Vieira, L. Q., B. D. Hondowicz, et al. (1994). "Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo." Immunol Lett **40**(2): 157-61.

- Wang, X. H., X. M. Ding, et al. (2011). "Simultaneous blockade of the CD40/CD40L and NF-kappaB pathways prolonged islet allograft survival." Transpl Int.
- Weigle, K. and N. G. Saravia (1996). "Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis." Clin Dermatol **14**(5): 433-50.
- WHO, W. H. O.-. (2010). "Web site." Retrieved May, 11, 2010, from <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>.
- WHO, W. H. O.-. (2012). "Web site." Retrieved July, 12, 2012, from <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>.
- World Health Organization, U., UNDP, World Bank, WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. (2011). Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance. W. L. C.-i.-P. Data, World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 2011: 46.
- Yamamoto, M. and S. Akira (2004). "[TIR domain--containing adaptors regulate TLR-mediated signaling pathways]." Nippon Rinsho **62**(12): 2197-203.
- Yamashita, M., M. Kaneko, et al. (2007). "Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellanedae*." Bioorg Med Chem Lett **17**(23): 6417-20.
- Zafarullah, M., W. Q. Li, et al. (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.
- Zofou, D., A. B. Kengne, et al. (2011). "In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of crude extracts and compounds from the stem bark of *Kigelia africana* (Lam.) Benth (Bignoniaceae)." Parasitol Res **108**(6): 1383-90.
- Zofou, D., M. Tene, et al. (2011). "Antimalarial drug interactions of compounds isolated from *Kigelia africana* (Bignoniaceae) and their synergism with artemether, against the multidrug-resistant W2mef *Plasmodium falciparum* strain." Parasitol Res **110**(2): 539-44.

APÊNDICE

Apêndice A – Artigo Aceito para Publicação

From: emmamissen@msn.com

Date: August 1, 2012 4:06:28 AM PDT

To: kjgollob@gmail.com

Subject: Parasite Immunology - PIM-2012-0030.R1

Dear Dr Gollob,

PIM-2012-0030.R1 Immunoregulatory Profile of Monocytes from Cutaneous Leishmaniasis Patients and Association with Lesion Size.

Thank you for submitting your revised manuscript to Parasite Immunology. The manuscript is almost suitable for publication, and if you can respond to the comments below, your paper would be acceptable for publication.

Please extend the flow cytometric diagrams in Figure 1 to show the gating for all the markers used in the study. Currently, no gating is shown for many of the markers (CD80, CD86, CD40, IL-12, IL-10 etc).

NB: I apologise for not spotting this omission during the first review.

****Please make sure that revisions to your manuscript are clearly marked****

You must either underline or use track changes to indicate the revisions to the text. Please also include a covering letter that responds to each of the reviewers' comments in detail.

To resubmit a paper log onto ScholarOne Manuscripts and enter your Author Centre. Select the menu option 'Manuscripts with Decisions', locate your paper in the list, select 'Create a Revision', then follow the online instructions.

With kind regards

Professor Eleanor Riley
Editor

In addition to the referee comments below please note we have added the following to our Instructions to Authors:

"Disclosures. For each author, disclose potential conflicts of interest, including all relevant financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding) in any company or institution that might benefit from the publication (or state 'none'). Authors do not need to report the sums concerned."

Please can you therefore add a small paragraph on the title page of your paper (underneath the details for correspondence) entitled "Disclosures" and then include any relevant details or "none" if there is nothing to disclose, if you have not already done so.

***** Keep up to date *****

Log in to your account on the Parasite Immunology homepage (if you don't have one you can register for one) and click 'Get New Content Alerts' to receive an email as soon as a new issue of the journal is published: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3024](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3024).

Artigo 1

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION
Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

Vol. 58 Nº 3, 2008

The prevalence of malnutrition and its risk factors in children attending outpatient clinics in the city of Manaus, Amazonas, Brazil

Marcelle M. M. Maia, Maria A. Fausto, Erica L. M. Vieira, Maria L. F. N. Benetton and Mariângela Carneiro

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, -Brazil.
Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Brazil. Departamento de Parasitologia,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Brazil

Artigo 2

Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 103, No. 7, 1–9 (2009)

Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil

M. M. M. MAIA*, M. A. FAUSTO[†], E. L. M. VIEIRA*, M. L. F. N. BENETTON[‡] and M. CARNEIRO*

**Programa de Pós Graduação em Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 486, 31279-901 Belo Horizonte, MG, Brazil*

[†]*Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário Morro do Cruzeiro, 35400-00 Ouro Preto, MG, Brazil*

[‡]*Universidade Federal do Amazonas, Avenida General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, Bairro Coroado, 69077-000 Manaus, AM, Brazil*

*Received 21 May 2009, Revised 5 July 2009,
Accepted 8 July 2009*

Gastrointestinal, Hepatobiliary and Pancreatic Pathology

Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis

Angélica T. Vieira,* Caio T. Fagundes,*
 Ana Leticia Alessandri,* Marina G.M. Castor,*
 Rodrigo Guabiraba,* Valdinéria O. Borges,*
 Kátia Daniella Silveira,* Erica L.M. Vieira,*
 Juliana L. Gonçalves,* Tarcília A. Silva,[†]
 Maud Deruaz,[‡] Amanda E.I. Proudfoot,[‡]
 Lirlândia P. Sousa,[§] and Mauro M. Teixeira*

From the Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, the Departamento de Clínica Patologia e Cirurgia,[†] Faculdade de Odontologia, Instituto de Ciências Biológicas, and the Setor de Patologia Clínica,[§] Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and MerckSerono,[‡] Geneva, Switzerland*

decreased eosinophil influx and greatly ameliorated colitis, suggesting that strategies that interfere with the recruitment of eosinophils may be useful as therapy for colitis. (*Am J Pathol* 2009, 175:2382–2391; DOI: 10.2353/ajpath.2009.090093)

Inflammatory bowel diseases (IBD), which include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease, are chronic, relapsing, and remitting inflammatory conditions of unknown origin that affect individuals of both sexes throughout life.^{1–3} The etiology of IBD remains unclear but presumably involves down-regulation of immunomodulatory mechanism and an uncontrolled activation of proinflammatory mediators. UC is a condition that

Artigo 4

JLB

Article

PI₃K γ controls leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality in a model of graft-versus-host disease in mice

Marina G. M. Castor,^{*,†} Bárbara M. Rezende,^{*,‡} Priscila T. T. Bernardes,^{*,‡}
 Angélica T. Vieira,* Érica L. M. Vieira,[‡] Rosa M. E. Arantes,^{||} Danielle G. Souza,^{*,§}
 Tarcília A. Silva,^{||} Mauro M. Teixeira,^{*,||} and Vanessa Pinho^{*,‡}

*Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, [†]Departamento de Fisiologia e Biofísica, [‡]Departamento de Morfologia, [§]Departamento de Microbiologia, ^{||}Laboratório de Neuro-Imunopatologia Experimental, Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, ^{††}Departamento Clínicas, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

RECEIVED AUGUST 20, 2010; REVISED FEBRUARY 18, 2011; ACCEPTED FEBRUARY 25, 2011. DOI: 10.1189/jlb.0810464

Resolution of Neutrophilic Inflammation by H₂O₂ in Antigen-Induced Arthritis

Fernando Lopes, Fernanda M. Coelho, Vivian V. Costa, Érica L. M. Vieira, Lirlândia P. Sousa, Tarcília A. Silva, Leda Q. Vieira, Mauro M. Teixeira, and Vanessa Pinho

Objective. Neutrophil accumulation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. This study was undertaken to examine the ability of H₂O₂ to influence neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis (AIA) in mice.

apoptotic neutrophils. Apoptosis was associated with an increase in Bax and caspase 3 cleavage and was secondary to phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt activation.

Conclusion. Our findings indicate that levels of

ARTICLE IN PRESS



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Nutritional Biochemistry xx (2011) xxx–xxx

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis[☆]

Erica L.M. Vieira^a, Alda J. Leonel^a, Alexandre P. Sad^a, Nathália R.M. Beltrão^a, Thaís F. Costa^a, Talita M.R. Ferreira^a, Ana C. Gomes-Santos^a, Ana M.C. Faria^a, Maria C.G. Peluzio^b, Denise C. Cara^c, Jacqueline I. Alvarez-Leite^{a,*}

^aDepartment of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30161-970 Brazil

^bDepartment of Nutrition, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 31270-910 Brazil

^cDepartment of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30161-970 Brazil

Received 10 August 2010; received in revised form 13 January 2011; accepted 19 January 2011

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance.
Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties

E.C. Aguilar¹, T.L. Jascolka², L.G. Teixeira¹, P.C. Lages¹, A.C.C. Ribeiro¹,
E.L.M. Vieira¹, M.C.G. Peluzio³ and J.I. Alvarez-Leite¹

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

³Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

ANEXO

Anexo A - Parecer do Ministério da Saúde para Liberação e Utilização do Medicamento Glucantime®



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
Coordenação Geral de Apoio ao Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços
SCS. Quadra 04, Bloco A – 5º Andar
CEP 70304-000 Brasília, DF
(61) 3213-8393/3213 -8394

PARECER TÉCNICO Nº 07 CGDEP/SVS/MS

ASSUNTO: Projeto de pesquisa “Estudo da resposta imune inata em monócitos e macrófagos contra a infecção por *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania chagasi*: Avaliação da infectividade, morte e Expressão de receptores do tipo Toll”.

INSTITUIÇÃO PROPONENTE: Universidade Federal de Minas Gerais – Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

PROPONENTE: Érica Leandro Marciano Vieira

ORIENTADOR: Dr. Kenneth John Gollob - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Co-ORIENTADORA: Dra. Walderez Ornelas Dutra

CONSIDERAÇÕES GERAIS:

O projeto de pesquisa se propõe a estudar os receptores Toll (TLR) e a produção de ROS e RNS em cultura de monócitos, macrófagos e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) durante a infecção com *L. brasiliensis* e *L. chagasi* em células de indivíduos infectados e em indivíduos sadios.

Trata-se de um projeto de pesquisa de Doutorado, este tem relevância científica, busca avaliar o efeito do tratamento da leishmaniose com antimônio pentavalente (Glucantime®) e os receptores do tipo Toll pertencentes a uma família de proteína transmembrânica do tipo I que formam uma parte do sistema imune nato. Os TLR são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos induzindo a

produção de sinais que ativam determinados genes importantes para uma defesa imune do hospedeiro, especialmente as citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, recentes estudos referem que microorganismos patogênicos podem modular ou interferir no reconhecimento de padrões mediados pelo TLR e podem utilizá-los como um mecanismo de escape do hospedeiro, resultando no aumento da suscetibilidade a parasitos, como a *Leishmania major*.

CONSIDERAÇÕES ESPECÍFICAS: Os aspectos relacionados a seguir deverão ser esclarecidos, detalhados e/ou justificados:

A Metodologia é apropriada, assim como o delineamento experimental. Todavia, salientamos que não há embasamento adequado que justifique que o tratamento com antimonial leve às alterações das vias a serem exploradas.

O tratamento das células será feito exclusivamente in vitro, quando é sabido que o antimonial é submetido a metabolização que pode alterar as suas ações in vivo. Ademais, o próprio tratamento com antimônio necessita de cuidados especiais (como a respeito do seu pH) que não são adequadamente explorados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O projeto é de relevância e justifica-se porque poderá dar uma resposta à melhoria do tratamento da leishmaniose humana. Apesar da justificativa que poderia ser mais bem fundamentada o projeto possui uma equipe técnica de pesquisadores de renome na área de pesquisa com leishmaniose. Possui financiamento, tem parecer de comitê de ética e a colaboração de diversas entidades de pesquisa, o que permite a viabilidade do projeto e o cumprimento do cronograma. Por ser uma pesquisa de relevância, onde o conhecimento da resposta TLR ainda é controversa, seus resultados deverão ser de grande repercussão. Desta forma, recomendamos a liberação do medicamento solicitado.

A Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços recomenda a área técnica que pactue com os pesquisadores o encaminhamento de

cópia da tese e dos artigos decorrentes e registrar a contribuição do Ministério da Saúde para com a pesquisa.

Brasília, 14 de fevereiro de 2011.



Ana Maria Johnson de Assis.
Responsável pela consolidação
dos pareceres

De acordo,



Susan Martins Pereira
Coordenadora da CGDEP/SVS