

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Luiza Cenizio Barbieri

**ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ANTIMÔNIO ASSOCIADO À
PENTOXIFILINA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN SITU* DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE MUCOSA**

Belo Horizonte
2012

Luiza Cenizio Barbieri

**ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ANTIMÔNIO ASSOCIADO À
PENTOXIFILINA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN SITU* DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE MUCOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Walderez Ornelas Dutra

Co-orientadora: Daniela Rodrigues de Faria

Belo Horizonte

2012

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Biologia das Interações Celulares e contou com a colaboração dos seguintes pesquisadores:

Centro de Biociências de Pesquisa em doenças Infecciosas- SRI International; Programa de Pós-graduação da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte:

- Dr. Kenneth J. Gollob.

Serviço de Imunologia Hospital Universitário Prof. Edgar Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA:

- Dr. Edgar Carvalho;
- Dr. Paulo Roberto Lima Machado;
- Dr. Luiz Henrique Guimarães

Orientadora: Walderez Ornelas Dutra

Co-orientadora: Daniela Rodrigues de Faria

Todos os procedimentos adotados durante a realização deste estudo estão aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 027/98 aprovado em 17/06/98).

Este trabalho conta com as seguintes agências financiadoras: TMRC/NIH; INCT-DT, CAPES, FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me iluminado, ter me dado força e sabedoria para enfrentar os obstáculos que nos deparamos na vida. Agradeço também a Ele por caminhar comigo constantemente, que me forneceu discernimento para escolher as oportunidades que surgiram na minha vida e por ter colocado pessoas maravilhosas, são anjos, no meu caminho.

Aos meus pais por todo amor incondicional e pela confiança depositada em mim, esse suporte é essencial para o equilíbrio psicológico e principalmente pelo apoio emocional. Ao meu querido irmão, o rei da paciência! Aos familiares e amigos.

Ao meu amado e queridíssimo marido Edmir, sempre ao meu lado! Sempre me incentivando a crescer e persistir, obrigada pelos pensamentos positivos e pelo apoio constante.

À minha orientadora Wal, que me recebeu com todo carinho e atenção. Acreditou no meu potencial e me possibilitou trabalhar com uma equipe maravilhosa. Obrigada pela orientação, diálogo, amizade, pelas oportunidades e aprendizado que tive durante esses anos. Agradeço ao Ken pelo apoio e todos os momentos de conhecimento científico.

À minha co-orientadora Dani, um anjo que Deus colocou no meu caminho. Agradeço pela ajuda de todos os momentos, desde o possível até o impossível! Obrigada pelos momentos de construção do conhecimento e de amizade! Agradeço ao Jr., pelas considerações e compreensão em dividir a Dani comigo!

À minha amiga Natália, ganhei uma amiga para a vida inteira, me deu força, me ajudou em vários momentos e sempre esteve comigo nesta caminhada.

Aos amigos do lab que estiveram comigo e que de alguma forma fizeram parte deste momento importante da minha vida.

Ao departamento de Morfologia, funcionários, professores e alunos. Principalmente aos colegas das aulas de Biologia Celular.

Aos colaboradores do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário coordenados pelo prof. Edgar Santos, UFBA em Salvador, Bahia, por ter nos cedido as amostras e pelo conhecimento adquirido. Aos pacientes que gentilmente doaram as lesões para a realização deste trabalho.

Aos amigos da Linhagen e Biocod, que me ajudaram e me deram força para seguir em frente. Muito obrigada por todos aqueles que, em algum momento dessa trilha, estiveram comigo!

RESUMO

A infecção humana por *Leishmania braziliensis* pode levar ao desenvolvimento de manifestações clínicas cutânea e mucosa, sendo que a forma clínica mucosa está associada à exacerbação da resposta imune inflamatória, causando extensa destruição do tecido. O tratamento da leishmaniose é, ainda hoje, baseado na utilização dos antimoniais pentavalentes (Sb^V). No entanto, a falha deste tratamento é comum e parasitos resistentes já foram detectados. Em virtude dos problemas decorrentes do tratamento com Sb^V , uma grande diversidade de terapias alternativas, de uso tópico ou sistêmico, vem sendo avaliada para o tratamento da leishmaniose. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do tratamento com antimônio associado ou não à Pentoxifilina (Ptx) na modulação da resposta imunológica *in situ* de pacientes com leishmaniose mucosa (LM). Foram avaliadas as frequências de linfócitos T $CD4^+$, T $CD8^+$ e macrófagos $CD68^+$, assim como a expressão das citocinas $IFN-\gamma^+$, $TNF-\alpha^+$ e $IL-10^+$ e da molécula citotóxica granzima A^+ , e a correlação entre estes parâmetros imunológicos, em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V ou Sb^V associado à Ptx. Para isto, foram realizadas reações de imunofluorescência e aquisição de imagens por microscopia confocal em cortes de lesões congeladas obtidas de pacientes com LM antes e após os diferentes tratamentos. Pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V apresentaram número de células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD68^+$ semelhantes. Não foi observada diferença significativa na expressão das diferentes citocinas e granzima A, comparando-se as lesões obtidas pré e pós-tratamento com Sb^V . Lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx apresentaram menor frequência de macrófagos $CD68^+$ quando comparado com lesões de pacientes com LM pré-tratamento, sem alteração nas frequências de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Não houve alteração na expressão de $IFN-\gamma$, $IL-10$ e granzima A pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx. No entanto, observou-se que o tratamento $Sb^V + Ptx$ leva a uma redução do número de células $CD68^+TNF-\alpha^+$. Não foram observadas diferenças nas frequências de populações celulares e citocinas comparando-se os tratamentos. O tratamento com Sb^V associado à Ptx induziu perda da correlação positiva tanto entre o infiltrado inflamatório e o número de células $TNF-\alpha^+$, como entre o número de células T $CD8^+$ e granzima A^+ . O tratamento de Ptx como adjuvante ao Sb^V pode resultar em uma modulação da resposta imunológica mais eficiente, o que pode explicar a cura mais rápida observada nesse tratamento, beneficiando a população infectada.

Palavras-chave: Leishmaniose Mucosa. *Leishmania braziliensis*. Antimônio Pentavalente. Pentoxifilina. Fator-alfa de Necrose Tumoral.

ABSTRACT

Human infection with *Leishmania braziliensis* can lead to cutaneous leishmaniasis (CL) or mucosal leishmaniasis (ML). ML is associated with exacerbation of inflammatory immune response, causing extensive damage tissue. Treatment of leishmaniasis is still based on the use of pentavalent antimony (Sb^{V}). However, the failure of this treatment is common and resistant parasites have been detected. Due to the problems resulting from Sb^{V} treatment a wide variety of alternative therapies has been evaluated for leishmaniasis treatment. The aim this study was to investigate the effect of antimony associated or not to pentoxifylline (Ptx) in the modulation of the *in situ* immune response of ML patients. We evaluated the frequency of T CD4^+ , CD8^+ cells and CD68^+ macrophages, as well as the expression of cytokines $\text{IFN-}\gamma^+$, $\text{TNF-}\alpha^+$ and IL-10^+ and cytotoxic molecules granzyme A^+ and the correlation between these immunological parameters in lesions from ML patients before and after Sb^{V} and Sb^{V} associated with Ptx treatment, by confocal microscopy. We did not observe differences in the numbers of the different cell populations or cytokines and granzyme A, comparing lesions from patients before and after treatment with Sb^{V} . Lesions from ML patients after Ptx associated with Sb^{V} treatment had lower frequency of macrophages, as compared to lesions before treatment. There was no change in expression of $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 and granzyme A in lesions from patients after Sb^{V} + Ptx treatment. However, Ptx associated with Sb^{V} treatment leads to a reduction in the number of $\text{CD68}^+\text{TNF-}\alpha^+$ cells. There were no differences in the frequencies of cell populations and cytokines comparing between lesions from patients submitted to the different treatments. The Ptx associated with Sb^{V} treatment induced loss of positive correlation between the inflammatory infiltrate and the number of $\text{TNF-}\alpha^+$ cells, as well as the number of CD8^+ T cells and granzyme A^+ cells. Ptx associated with Sb^{V} treatment may result in a modulation of the immune response more efficient and consequently an accelerated healing.

Keywords: Mucosal Leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Treatment. Pentavalent Antimonial. Pentoxifylline. Tumor necrosis factor.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Características clínicas dos pacientes com LM avaliados neste estudo..	20
QUADRO 2 – Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência indireta.....	22
QUADRO 3 – Combinações de anticorpos utilizados para imunofluorescência indireta.....	22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número total de células inflamatórias por campo e frequências de células mononucleares e polimorfonucleares em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	27
TABELA 2 – Quantificação de células IFN- γ ⁺ e contribuição de células T CD4 ⁺ para a produção desta citocina em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	34
TABELA 3 – Quantificação de células TNF- α ⁺ e contribuição de células CD68 ⁺ para a produção desta citocina em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	37
TABELA 4 – Quantificação de células IL-10 ⁺ e contribuição de células CD68 ⁺ para a produção desta citocina em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	40
TABELA 5 – Quantificação de células granzima A ⁺ e contribuição de células T CD8 ⁺ para a produção desta molécula em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração da picada do flebotomíneo fêmea e formação do <i>pool</i> hemorrágico com formas promastigotas.....	3
FIGURA 2 – Apoptose: uma forma de evitar a ativação da resposta imune do hospedeiro e promover a sobrevivência do parasito.....	8
FIGURA 3 – Imagem representativa de análise por Microscopia Confocal para quantificação de populações celulares e expressão de citocinas e da molécula citotóxica granzima A presente em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	255
FIGURA 4 – Cortes de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx corados com hematoxilina e eosina (HE).	28
FIGURA 5 – Análise comparativa do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	29
FIGURA 6 – Análise comparativa da frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD68 ⁺ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.	311
FIGURA 7 – Análise comparativa do número de células IFN- γ ⁺ e CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	333
FIGURA 8 – Análise comparativa do número de células TNF- α ⁺ e CD68 ⁺ TNF- α ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V associado à Ptx.	36
FIGURA 9 – Análise comparativa do número de células IL-10 ⁺ e CD68 ⁺ IL-10 ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	39
FIGURA 10 – Análise comparativa do número de células granzima A ⁺ e CD8 ⁺ GrA ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	422
FIGURA 11 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD4 ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	444
FIGURA 12 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD8 ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	455
FIGURA 13 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células CD68 ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	466
FIGURA 14 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IFN- γ ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	477

FIGURA 15 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células TNF- α^+ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx.....	488
FIGURA 16 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10 ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx..	49
FIGURA 17 – Análise de correlação entre o número de células T CD8 ⁺ e o número de células granzima A ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx..	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- APC – Célula apresentadora de antígeno
- BSA – Albumina Sérica Bovina
- C3 – Complemento 3
- CCL – *Chemokine (C-C motif)*
- CD – *Cluster of Differentiation*
- CR – Receptor de complemento
- CTL – Controle de isotipo
- DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*
- DN – Duplo-negativas
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- FasR – Receptor Fas
- FITC – Isotiacianato de fluoresceína
- GM-CSF – Fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos
- Gp63 – glicoproteína 63
- GrA – Granzima A
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HE – Hematoxilina e eosina
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- HTLV - *Human T lymphotropic virus*
- ICAM – Molécula de adesão intercellular
- IFN- γ – Interferon-gama
- IL – Interleucina
- iNOS – Óxido nítrico sintase indutível
- I κ B – *Inhibitor of kappa B*
- L. braziliensis* – *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- LC – Leishmaniose cutânea
- LCD – Leishmaniose cutânea-difusa
- LFA – Antígeno associado à função do leucócito
- LM – Leishmaniose mucosa
- LMC – Leishmaniose mucocutânea
- LPG – Lipofosfoglicano
- LPS – Lipopolissacarídeo

LV – Leishmaniose visceral
Mac – Antígeno do macrófago
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
NF- κ B – *Nuclear factor kappa-B*
NK – Célula *natural killer*
NO – Óxido nítrico
O₂⁻ – Ânion óxido
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBMC – Células mononucleadas do sangue periférico
PBS – Tampão salina-fosfato
PCR – Reação da cadeia da polimerase
PE – Ficoeritrina
PMN – Polimorfonucleares
Ptx – Pentoxifilina
RTNF – Receptor de fator de necrose tumoral
Sb^{III} – Antimônio trivalente
Sb^V – Antimônio pentavalente
TCR – Receptor de células T
TGF- β – *transforming growth factor beta*
Th – Células T auxiliaries
Tregs – Células T regulatórias
TIA – *T-cell intracellular antigen*
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1 Leishmaniose.....	1
1.2 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	1
1.3 Formas Clínicas da Leishmaniose.....	3
1.4 Uma breve introdução sobre aspectos gerais da resposta imunológica	5
1.4.1 Diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺	5
1.4.2 Citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10.....	6
1.5 Infecção por <i>Leishmania</i> e a ativação de células da resposta inata.....	6
1.6 Linfócitos T na leishmaniose humana.....	10
1.7 Tratamento da leishmaniose.....	13
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Seleção dos pacientes	20
3.2 Coleta do material e obtenção dos cortes	21
3.3 Coloração histológica.....	21
3.4 Análises histopatológicas das imagens por Microscopia Óptica	21
3.5 Reações de imunofluorescência	22
3.6 Microscopia Confocal	23
3.7 Análises das imagens obtidas por Microscopia Confocal.....	24
3.8 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Caracterização do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	27
4.1.1 Análise histopatológica em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx)	27
4.1.2 Análise comparativa do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	29
4.1.3 Análise comparativa da frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD68 ⁺ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	30
4.2 Expressão das diferentes citocinas e molécula citotóxica granzima A em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx)	32
4.2.1 Análise comparativa do número de células expressando IFN- γ e CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx)	32
4.2.2 Análise comparativa do número de células expressando TNF- α e CD68 ⁺ TNF- α ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb ^V e Sb ^V associado à Ptx).....	35

4.2.3	<i>Análise comparativa do número de células expressando IL-10 e CD68⁺IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)</i>	38
4.2.4	<i>Análise comparativa do número de células expressando granzima A e CD8⁺GrA⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	41
4.3	<i>Correlações entre o infiltrado inflamatório e populações celulares em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)</i>	44
4.3.1	<i>Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD4⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	44
4.3.2	<i>Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	45
4.3.3	<i>Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células CD68⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	46
4.4	<i>Correlações entre o infiltrado inflamatório e diferentes citocinas em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)</i>	47
4.4.1	<i>Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IFN-γ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	47
4.4.2	<i>Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células TNF-α⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	48
4.4.3	<i>Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	49
4.5.	<i>Correlação entre população celular e expressão da molécula citotóxica granzima A em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	50
4.5.1	<i>Correlação entre o número de células T CD8⁺ expressando granzima A em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).....</i>	50
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por diferentes espécies de protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. Estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas em 88 países estejam em risco de adquirir a doença e que a incidência anual da doença possa variar de 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). Especificamente no Brasil, o Ministério da Saúde relata uma incidência anual em torno de 28.000 casos de leishmaniose (SOUZA et al., 2010). Essa doença é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, mas viagens para a América Latina, por exemplo, tem se tornado cada vez mais comuns, com isso, observa-se o aumento do número de casos de leishmaniose em regiões não endêmicas (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006). Sendo assim, ao atingir uma região indene, a doença é considerada emergente e re-emergente devido ao preocupante aumento de sua incidência, principalmente nas duas últimas décadas (GOTO; LINDOSO, 2010). Este aumento tem ocorrido em certas partes do mundo, uma vez que pessoas de áreas rurais migram para áreas urbanas a procura de oportunidades de trabalho; também ocorre migração em consequência de guerra, perturbações em microambientes, devido à intervenção humana e alterações climáticas, deterioração das condições socioeconômicas e presença de co-infecção de HIV/*Leishmania* (DESJEUX apud GOTO; LINDOSO, 2010).

1.2 Ciclo de vida da *Leishmania*

O agente etiológico da leishmaniose tem um ciclo de vida dimorfo constituído de promastigotas extracelulares, se multiplicam por divisão binária e se desenvolvem dentro do intestino de insetos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (velho mundo) ou *Lutzomyia* (novo mundo). A outra forma é caracterizada por amastigotas intracelulares, que residem e se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos (WEIGLE; SARAIVA, 1996; JOSHI et al., 2002). Vários animais vertebrados são considerados reservatórios naturais da *Leishmania*, como mamíferos sinantrópicos e animais silvestres. Diversos mamíferos podem ser infectados por *Leishmania sp*; entretanto, não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem (LUPPI et al., 2008). Pesquisadores afirmam que, na região da Zona da Mata do estado de Pernambuco, o roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (rato do mato) é o

reservatório primário da *Leishmania braziliensis* para leishmaniose tegumentar (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Enquanto para leishmaniose visceral, geralmente, os canídeos estão associados aos reservatórios de *Leishmania infantum* na região das Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

A transmissão de parasitos do gênero *Leishmania* pode se iniciar durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos em hospedeiros vertebrados infectados. Então o flebotomíneo, ao inserir a probóscide, provoca a laceração dos vasos sanguíneos formando um *pool* (poço) hemorrágico, e assim, ingere as células fagocitárias contendo formas amastigotas (Fig. 1A) (RIBEIRO, 1987; DE ALMEIDA et al., 2003).

No interior do intestino do inseto, amastigotas se diferenciam em promastigotas não infectantes (procíclicas) móveis e se aderem ao epitélio do intestino médio para evitar sua excreção. As formas procíclicas expressam moléculas curtas de lipofosfoglicano (LPG), que cobrem toda a superfície do parasito, inclusive o flagelo (SACKS; PERKINS, 1985; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). A virulência é adquirida durante a metaciclogênese, um processo em que promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas (SACKS; PERKINS, 1985; DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Após esse processo, promastigotas metacíclicas se desprendem do epitélio do intestino, migram para a extremidade anterior do trato digestivo e secretam uma substância de consistência gelatinosa, formando uma obstrução física. Tal fenômeno desempenha um papel fundamental na transmissão, uma vez que induz o mosquito a regurgitá-las (SACKS; PERKINS, 1985; BATES; ROGERS, 2004).

No próximo repasto sanguíneo, as promastigotas regurgitadas são inoculadas no hospedeiro vertebrado (Fig. 1B) e fagocitadas, passando a viver dentro dos vacúolos parasitóforos. Nos vacúolos, os parasitos assumem a forma amastigota e sofrem sucessivas multiplicações ocasionando um crescimento exponencial (WEIGLE; SARAVIA, 1996; DE ALMEIDA et al., 2003). Após este crescimento, as células se rompem e liberam as formas amastigotas no interstício, onde serão fagocitadas. O elevado parasitismo gera no hospedeiro um processo de reatividade celular diretamente relacionado aos mecanismos de resistência ou ao estabelecimento da doença (MOSSER, 1990; GOLLOB; ANTONELLI; DUTRA, 2005).

Figura 1 – Ilustração da picada do flebotomíneo fêmea e formação do *pool* hemorrágico com formas promastigotas

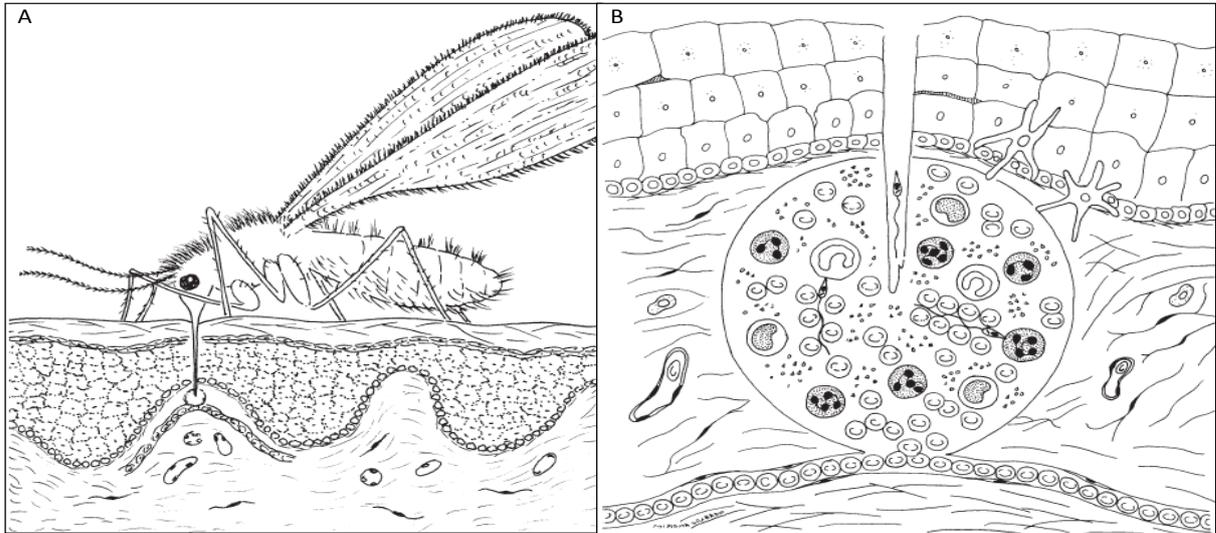


Figura 1: Ilustração da picada do flebotomíneo fêmea (A). No *pool* hemorrágico há parasitos na forma promastigota aderidos aos eritrócitos e monócito (à esquerda da probóscide) e neutrófilo (à direita da probóscide). Na interface dermo-epidérmica há duas células de Langerhans (B). Os elementos celulares não são proporcionais (DE ALMEIDA et al., 2003 - modificado).

1.3 Formas Clínicas da Leishmaniose

A leishmaniose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que depende da associação das características da espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro. Entre os componentes do sistema imunológico do hospedeiro que pode interferir e favorecer o desenvolvimento das formas clínicas da doença, a imunidade mediada por células parece ser um dos parâmetros determinantes (GOLLOB et al., 2008; KAYE; SCOTT, 2011).

Até o momento, as formas clínicas bem caracterizadas da doença são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea-difusa (LCD), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (CUNNINGHAM, 2002; VIEIRA-GONÇALVES et al., 2008). Uma forma menos comum mas de incidência crescente é a leishmaniose disseminada (MACHADO et al., 2011).

A *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* causam a LC, que é a forma mais branda e comum da doença, caracterizada por lesões exclusivamente cutâneas, ulceradas ou não, que cicatrizam após algumas semanas ou meses. A lesão cutânea ulcerada única é o tipo de apresentação mais comum, é arredondada ou ovóide, de tamanho variável, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritromatosas com fundo granuloso (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000).

Pesquisadores observaram que *Leishmania amazonensis* pode causar LCD, que é caracterizada pela presença de numerosos nódulos não ulcerados, onde os macrófagos estão repletos de formas amastigotas. Geralmente os pacientes não apresentam resposta eficaz à terapia, ocasionando longa duração da doença e uma progressão incontrolável pela deficiência da resposta imunológica específica mediada por células (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007). Além da LCD, manifestações incomuns têm sido descritas, como a leishmaniose cutânea disseminada (LD), esta é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões pleomórficas mas, diferentemente da LCD, apresenta poucos parasitos (TURETZ et al., 2002; VIEIRA-GONÇALVES et al., 2008).

A LM é causada por *Leishmania braziliensis*, é caracterizada pela lesão da mucosa sem o acometimento cutâneo e resulta da disseminação hematogênica ou linfática de amastigotas para a mucosa nasal, oral, orofaringe e/ou laringe (HERWALDT, 1999; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). Os indivíduos acometidos por LM apresentam lesões desfigurantes, geralmente localizadas no nariz e na boca, podendo também afetar a laringe e a traquéia (CASTÉS; AGNELLI; RONDÓN, 1984; FARIA, et al., 2005). As complicações de LM incluem a perfuração nasal, rouquidão, devido ao comprometimento das cordas vocais e deformidade da pirâmide nasal. Atualmente a patogênese da LM é pouco compreendida, parece ser altamente dependente da resposta imune mediada por células. Além disso, a escassez de parasitos nas lesões mucosas contribui com esse contexto (LESSA et al., 2001).

A característica da LMC é a lesão da pele com o comprometimento concomitante da mucosa. Apresenta manifestações distintas da LC e LM, em que o paciente desenvolve os sintomas da LM logo após o aparecimento das lesões cutâneas e, no entanto, tem uma duração mais curta do que a LM (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000). A LMC é causada por *Leishmania braziliensis* e apresenta mais de uma lesão cutânea, podendo estar associada à resposta imune inapropriada e/ou às características da espécie do parasito (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000).

Na LV ou calazar, a forma mais grave da doença, desenvolvida por alguns indivíduos infectados com *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides. Os indivíduos afetados apresentam saliência do abdômen devido ao aumento do fígado e do baço, hemorragia nas mucosas, dificuldades respiratórias e diarreia (CUNNINGHAM, 2002).

Independentemente da forma clínica, as lesões são a consequência patológica mais importante da leishmaniose uma vez que, em muitos casos, as lesões são mutilantes e debilitantes, comprometendo a vida econômica e social do indivíduo afetado.

1.4 Uma breve introdução sobre aspectos gerais da resposta imunológica

1.4.1 Diferenciação de linfócitos T CD4⁺

A imunidade inata baseia-se no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos por um número limitado de receptores. Enquanto a imunidade adaptativa permite o reconhecimento de um repertório ilimitado de antígenos por receptores específicos, acentua os mecanismos protetores da imunidade inata e os direciona para o local da infecção (CLARK et al., 2006). Em uma doença crônica, a resposta adaptativa é prevalente, porém a resposta inata atua concomitantemente. Existem dois tipos de respostas imunológicas adquiridas, a imunidade humoral e imunidade celular, que são mediadas por diferentes componentes, as principais células são linfócitos B e T, respectivamente (SHARMA; SINGH, 2009).

O estabelecimento de respostas inata e adaptativa possui um papel fundamental na leishmaniose. A resposta imune induzida por *Leishmania* estimula os mecanismos efetores da imunidade celular. Grande parte dos parasitos escapam da resposta imune humoral por residir no fagolisossomo dos macrófagos (CUNNINGHAM, 2002; ALMEIDA et al., 2003). Estudos têm demonstrado que células T prevalecem na composição do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LC e LM, seguido por macrófagos e muito pouco ou ausentes as células B e *natural killer* (NK). Esses estudos reforçam o argumento que as células T desempenham um papel crítico na leishmaniose (ESTERRE et al., 1994; RIBEIRO DE JESUS et al., 1998; BOTTREL et al., 2001).

As células T CD4⁺ podem se diferenciar em células efectoras tipo Th1, Th2, Th3, Th17 e Tregs. A determinação desse perfil imunológico depende de vários fatores, incluindo a genética do hospedeiro, o tipo de célula apresentadora de antígenos (APC) envolvida na ativação, o tipo de co-receptor e principalmente as citocinas produzidas no momento do reconhecimento antigênico. No entanto, já foi claramente demonstrado que as citocinas são os elementos críticos para determinar a diferenciação celular (GOLLOB et al., 1996; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004). A presença predominantemente de citocinas como IFN- γ e IL-12 no microambiente tende a levar ao desenvolvimento de células tipo Th1 (PARK; HONDOWICZ; SCOTT, 2000; SCOTT; HUNTER, 2002). De modo inverso, a presença predominante de IL-4 e IL-5 tende a levar o desenvolvimento de células tipo Th2 (GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004).

As células Tregs em termos mais amplos consistem de subconjuntos de distintas células T, que se caracterizam por sua capacidade de suprimir a proliferação de células T

efetoras (ENK, 2006). As células Tregs CD4⁺ podem ser classificadas em induzidas, tais como: células Treg-1 e Th3, caracterizadas pela secreção de IL-10 e TGF- β , que bloqueiam a proliferação de células T CD4⁺ convencionais (LEVINGS et al., 2002; WEINER, 2001). As células conhecidas como Tregs CD4⁺CD25⁺, que ocorrem naturalmente, bloqueiam a proliferação de células T via interação célula a célula (ENK, 2006).

Além dos padrões de diferenciação mencionados, acredita-se que a diferenciação para o padrão Th17 se dá na presença de IL-6 e TGF- β , juntamente com IL-23 e IL-1 β , que induzem a diferenciação e manutenção de linfócitos T CD4⁺ em células produtoras de IL-17 (VOLPE et al., 2008; WILSON et al., 2007 apud BOAVENTURA et al., 2010).

1.4.2 Citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10

Em um ambiente inflamatório há diferentes tipos de citocinas, que podem ser agrupadas em duas subdivisões principais de acordo com suas funções, pró e antiinflamatórias. A citocina pró-inflamatória TNF- α é considerada uma das mais importantes do sistema imune inato e está envolvida na ativação endotelial e indução de febre. Esta citocina é conhecida por ter inúmeras propriedades biológicas relacionadas à inflamação (RIBEIRO DE JESUS et al., 2008); pode ser produzida por células NK, linfócitos T e macrófagos ativados (BEUTLER, 1995; GOLLOB et al., 2008; ROUSE; SEHRAWAT, 2010). A citocina pró-inflamatória IFN- γ também pode ser produzida por linfócitos T, células B e células NK estimuladas por IL-12 (AKDIS et al., 2011).

A citocina IL-10 é a principal citocina anti-inflamatória; assim, tem função relevante por regular respostas inflamatórias e controlar a ativação de macrófagos (GOLLOB et al., 2008). É produzida por monócitos, células T, células B, macrófagos e células dendríticas (AKDIS et al., 2011). Sua principal função é modular a resposta imune, inibir os macrófagos ativados e evitar a exacerbação dessa resposta. Esta citocina também é capaz de modular resposta tipo Th2 (MOCCI; COFFMAN, 1995; MURAILLE; LEO, 1998). A produção de IL-10 em ser humano não é um fator típico de células Th2, pois tanto células Th1 como Th2 e Tregs são capazes de produzir IL-10. Além disso, esta citocina inibe a expressão de IL-12 e TNF- α , exercendo assim um papel relevante na resposta inflamatória (AKDIS et al., 2011).

1.5 Infecção por *Leishmania* e a ativação de células da resposta inata

A infecção pelo parasito é o estímulo inicial para desencadear uma cascata de eventos que pode favorecer no estabelecimento da lesão inflamatória. O recrutamento das células para o sítio inflamatório depende de uma reação complexa que ocorre em tecidos conjuntivos vascularizados e envolvem componentes da matriz extracelular e do tecido, vasos sanguíneos, plaquetas ativadas e células circulantes (PETERS et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011). As plaquetas desempenham um importante papel na homeostasia em virtude de sua capacidade de se tornarem ativadas em resposta ao dano do endotélio vascular. Recentemente, foi observado que na infecção por *Leishmania major* plaquetas ativadas liberam fator de crescimento que induz a secreção de quimiocinas, como CCL2, por leucócitos, desempenhando um importante papel na atração de monócitos/macrófagos para o sítio da infecção. Entretanto, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas (GONÇALVES et al., 2011).

Estudos demonstram que após a inoculação da probóscide do flebotomíneo fêmea, um robusto e rápido recrutamento de neutrófilos é induzido devido ao dano tecidual, independentemente da presença de parasitos. De forma semelhante, quando formas promastigotas da *Leishmania* são inoculadas, também ocorre, rapidamente, a migração de neutrófilos para o local da infecção e sucessiva fagocitose desses parasitos (PETERS et al., 2008). Alguns neutrófilos albergam os parasitos no início da infecção, mas não os eliminam, estes permanecem viáveis (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Assim, a captação inicial de parasitos por neutrófilos pode ser importante no recrutamento e subsequente modulação dos macrófagos, que são células hospedeiras ideais para a sobrevivência do parasito (PETERS et al., 2008).

Os neutrófilos infectados por *Leishmania* sofrem apoptose após dois ou três dias e, então, são fagocitados por macrófagos mediante identificação de fosfatidil serina na superfície. A ingestão de células apoptóticas não ativa a função microbicida dos macrófagos, sendo uma via de entrada ideal e silenciosa da *Leishmania* nas células do hospedeiro (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Uma estratégia desenvolvida por estes parasitos para escapar da resposta imune do hospedeiro é utilizar células apoptóticas como vetores ou imitar células de mamíferos em apoptose. Alguns destes mecanismos estão representados na Fig. 2 (NYLÉN; GAUTAM, 2010). Outra via silenciosa de internalização do parasito nos macrófagos é por meio do sistema complemento (via alternativa). Provavelmente as moléculas de superfície LPG e gp63 da *Leishmania*, que em contato com as unidades C3b e C3bi do sistema complemento, interagem com os receptores CR1 e CR3 da superfície de macrófagos, respectivamente (MOSSER; EDELSON, 1987 apud PETERS; SACKS, 2006;

WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983 apud MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008). No entanto, LPG não é extremamente necessário para a ligação ou internalização de promastigotas, uma vez que *Leishmania* com deficiência na síntese de fosfoglicano foi internalizada com a mesma eficiência, embora a presença de LPG seja necessária para a sobrevivência intracelular do parasito (MC NEELY; TURCO, 1990 apud LODGE; DESCOTEAUX, 2005). Existem outros receptores envolvidos na interação do macrófago com *Leishmania*, tais como receptor de manose-fucose, receptor de fibronectina, dentre outros (DA SILVA et al., 1988). A fagocitose por opsonização não induz respostas pró-inflamatórias provenientes dos macrófagos, quando comparado com parasitos não opsonizados. Isto favorece maior sobrevivência intracelular e crescimento do parasito (PETERS; SACKS, 2006).

Figura 2 – Apoptose: uma forma de evitar a ativação da resposta imune do hospedeiro e promover a sobrevivência do parasito

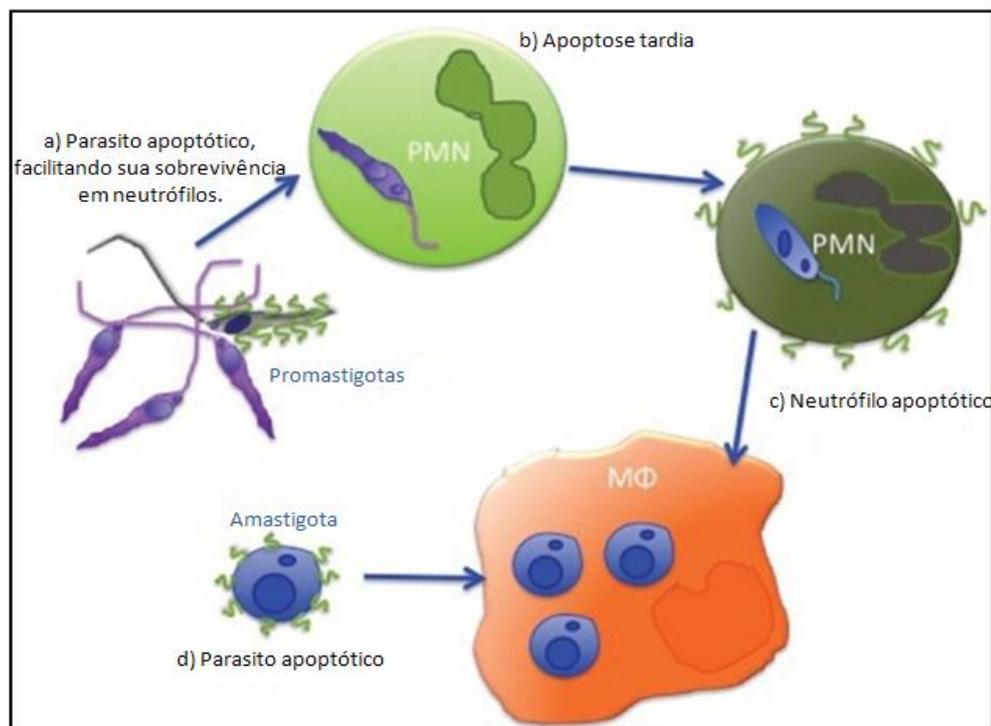


Figura 2: Parasitos apoptóticos juntamente com formas promastigotas viáveis, facilitam a infecção e impedem a ativação de neutrófilos (PMN) (a); parasitos retardam a apoptose de neutrófilos, o que propicia a migração de macrófagos (MΦ) para o local da infecção (b); entrada silenciosa do parasito em macrófagos através dos neutrófilos apoptóticos (c); amastigotas viáveis expõem fosfatidil serina e imitam células apoptóticas (d). Isso facilita a internalização e aumenta a susceptibilidade de macrófagos para o crescimento de *Leishmania* (NYLÉN; GAUTAM, 2010 - modificado).

Após a fagocitose pelo macrófago, os parasitos se encontram em um vacúolo, que é inicialmente formado pela invaginação da membrana plasmática, sendo considerado um fagossomo. Este sofre várias transformações e interage com organelas endocíticas, cujo

processo refere-se à maturação do fagossomo, que geralmente leva à formação de fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo. Uma vez internalizadas, as formas promastigotas sofrem mudanças bioquímicas e metabólicas, diferenciando-se na forma amastigota. (LODGE; DESCOTEAUX, 2005).

A ativação dos macrófagos é o primeiro mecanismo para eliminar o parasito *Leishmania*, presumivelmente mediada por metabólitos tóxicos de oxigênio, como ânion óxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO). Uma variedade de estímulos pode induzir alterações nas características morfológicas, bioquímicas e funcionais de macrófagos ativados. IFN- γ atua na produção de NO através da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). IFN- γ sinergiza com TNF- α e induz a expressão de iNOS. A ativação de iNOS leva à síntese de NO e morte da *Leishmania* (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004, TUON et al., 2008a, SOUZA et al., 2010). NO é a molécula mais importante responsável pela destruição dos parasitos *Leishmania* por macrófagos, está envolvida com a reatividade inflamatória e outros mecanismos como destruição tecidual (PANARO et al., 2001). Embora IFN- γ e TNF- α possam atuar no controle da multiplicação do parasito, eles também podem estar envolvidos na patogênese da doença, quando são produzidos em altos níveis em associação com uma produção relativamente baixa de IL-10 (RIBEIRO DE JESUS et al., 1998). Desse modo, altos níveis de IFN- γ e TNF- α , uma atividade inflamatória aumentada, associados à baixa expressão de receptor de IL-10 podem ser responsáveis pela resposta inflamatória não modulada que é observada na LM (FARIA et al., 2005).

Embora o macrófago desenvolva mecanismos efetores que protejam o hospedeiro dos parasitos intracelulares, estes possuem mecanismos adaptativos que evitam e modulam a resposta inflamatória como forma de persistência no tecido (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Um fenômeno crucial para a sobrevivência do parasito é a alteração das vias de sinalização de macrófagos e sua expressão gênica, um mecanismo dependente da protease gp63. *Leishmania* ao infectar o macrófago, derivado de camundongo, causa clivagem específica do fator de transcrição NF- κ B. A clivagem ocorre no citoplasma, o fragmento resultante migra para o núcleo e, então, é capaz de ativar a transcrição gênica para expressão de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de macrófagos. Esse mecanismo desenvolvido por patógenos intracelulares pode subverter vias regulatórias de macrófagos por alterar a atividade de NF- κ B (GREGORY et al., 2008). Essas alterações provocadas pelos parasitos propiciam sua sobrevivência e após sucessivas replicações há o rompimento do macrófago e liberação de amastigotas.

1.6 Linfócitos T na leishmaniose humana

Os parasitos fagocitados por células APCs são processados e apresentados via MHC (complexo de histocompatibilidade principal) (LODGE; DESCOTEAUX, 2005). Estas células migram para o linfonodo e ativam células T “virgens”, presentes em maior quantidade neste órgão linfóide. A ativação dos linfócitos T ocorre mediante sinais distintos. O primeiro sinal é a ligação do receptor de células T (TCR), co-receptores CD4 ou CD8, ao MHC-II ou MHC-I da APC, o que promove o reconhecimento do antígeno. O segundo sinal é promovido pelas moléculas co-estimuladoras, que propicia a expansão clonal (MAROOF et al., 2009). Para que a proliferação não seja exacerbada, o terceiro sinal é inibitório, e consiste em moléculas estruturalmente homólogas às moléculas co-estimuladoras com função de inibir a ativação de células T (GRAY et al., 2006). Desse modo, seu papel envolve o controle das respostas destas células. As células T que foram especificamente ativadas pelo antígeno, executam funções efetoras e são capazes de produzir citocinas e substâncias citotóxicas que levam à eliminação do antígeno. Estas células saem do órgão linfóide, caem na corrente sanguínea e migram para o sítio da infecção para exercerem suas funções (XIN et al., 2011).

Os linfócitos T e B antígeno-específicos recrutados podem permanecer no sítio de infecção por vários dias. Este recrutamento celular acontece em resposta a mediadores solúveis, como as quimiocinas e citocinas, que são produzidos por células presentes no local onde se estabelece a inflamação (PETERS; SACKS, 2006; DEAK et al., 2010).

Durante a fase de ativação dos linfócitos T, os eventos que culminam com o reconhecimento do antígeno, são mediados por moléculas distintas, dentre elas o TCR. Existem duas linhagens de linfócitos T, provenientes de um progenitor linfóide comum, que são caracterizados por apresentarem dois tipos distintos de TCRs, $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (XIN et al., 2011). A maioria das células T que expressa o receptor $\alpha\beta$ também expressa os co-receptores CD4 ou CD8, que são expressos em minoria pelas células $\gamma\delta$. Além disso, existe uma subpopulação minoritária de células T que não expressa a molécula CD4 nem CD8, assim denominadas duplo-negativas (DN) e podem expressar ambos TCRs, $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (GOLLOB et al., 2008).

Na leishmaniose humana, as células DN foram consideradas o segundo tipo celular mais relevante na produção de IFN- γ , uma vez que células T CD4⁺ são responsáveis pela maior produção dessa citocina (BOTTEL, 2001). É importante ressaltar que células T DN

$\alpha\beta$ estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* apresentaram alta razão IFN- γ e TNF- α /IL-10, enquanto as células T DN $\gamma\delta$ apresentaram alta produção de IL-10 em relação ao IFN- γ e ao TNF- α . Com isso, parece que o papel de células T DN $\alpha\beta$ está relacionado com a ativação da atividade leishmanicida e possivelmente na evolução da leishmaniose (se não for regulada), enquanto as células T DN $\gamma\delta$ parecem estar mais relacionadas à regulação dessa atividade (ANTONELLI et al., 2006 apud GOLLOB et al., 2008).

Recentemente estudos demonstraram que lesões de pacientes com LM apresentaram um infiltrado inflamatório mais intenso do que o observado em pacientes com LC, caracterizado pela presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (FARIA et al., 2005). As distintas fases da evolução da leishmaniose apresentam diferenças no perfil de subpopulações linfocitárias. As características funcionais dos linfócitos T circulantes reativos para *Leishmania braziliensis*, em pacientes com LC apresentam na fase ativa da doença, uma maior frequência de células T CD4⁺ e uma mistura do perfil da produção de citocinas (tipo 1 e tipo 2) (DA-CRUZ et al., 2002). Estudos em pacientes com leishmaniose tegumentar, infectados por *L. braziliensis*, sugerem que a resposta celular do tipo Th1 exacerbada está associada à forma grave da doença, a LM (DA-CRUZ et al., 2005). Faria e colaboradores (2005) demonstraram que lesões de pacientes com LM apresentam maior intensidade de expressão de IFN- γ em relação aos pacientes com LC. Além disso, foi observado maior frequência da expressão de IFN- γ por células T CD4⁺ associada às maiores lesões de pacientes com LC, sugerindo a participação desta citocina na evolução da patogênese (ANTONELLI et al., 2005 apud GOLLOB et al., 2008).

A interleucina 17 é produzida predominantemente por células Th17 (BACELLAR et al., 2009). Poucos estudos têm avaliado o papel da IL-17 em doenças infecciosas humanas, e não se sabe se essa citocina participa como um mecanismo de defesa ou na patogênese dessas doenças. Bacellar e colaboradores (2009) mostraram que linfócitos obtidos de pacientes com LC e LM produzem níveis mais altos de IL-17 do que os linfócitos de indivíduos não infectados. Além disso, observaram que, em lesões de pacientes com LM, houve uma tendência do aumento de células que expressam IL-17, em comparação com as lesões de pacientes com LC, e houve correlação direta entre o número de células expressando IL-17 e a presença de inflamação celular no sítio da lesão. Estes dados sugerem que IL-17 está envolvida na patogênese da leishmaniose.

Durante a evolução da leishmaniose humana, além dos diferentes perfis imunológicos, foi observado que, pacientes com LC submetidos a tratamento apresentaram um aumento das

células T CD8⁺ e um declínio de células T CD4⁺ no fim da terapia. Enquanto nos pacientes com LM, esse fenômeno foi observado, aproximadamente, seis meses após a terapia. Esses eventos podem estar relacionados à gravidade da LM, levando a longos períodos para resolução das lesões após o tratamento. Desse modo, parece que o processo de cura da leishmaniose está associado com um aumento de células T CD8⁺ (DA-CRUZ et al., 2002). Por outro lado, foi observado que pacientes com LM não tratados apresentaram maior atividade citotóxica por células T CD8⁺, quando comparado com os pacientes com LC. Possivelmente esta alta toxicidade pode estar associada ao dano tecidual e à gravidade da forma mucosa (BRODSKYN et al., 1997). Assim, o papel de células T CD8⁺ ainda é controverso e possivelmente diferente em formas clínicas distintas ou em estágios distintos da infecção.

As células T CD8⁺ ativadas atuam como células T citotóxicas que liberam grânulos líticos após o reconhecimento do antígeno na superfície da célula-alvo. Desse modo, os linfócitos T citotóxicos utilizam um mecanismo rápido de morte celular (PINKOSKI; GREEN, 2003). As células T CD8⁺ podem destruir a célula-alvo tanto por liberar o conteúdo dos grânulos líticos na via de exocitose de citotoxicidade, como pela ligação de receptores de morte da superfície celular, tais como os membros da família de receptores de fator de necrose tumoral (RTNF), incluindo FasR (CD95). A apoptose via receptor de morte é mediada por caspase e alguns mecanismos da via de citotoxicidade mediada por grânulos, ocasiona a morte celular independente de caspase (LIEBERMAN, 2003).

Os grânulos líticos são lisossomos modificados que contêm proteínas efetoras citotóxicas. Essas proteínas são as perforinas, formadoras de poros, e uma família de proteases serinas conhecidas como granzimas. Com o auxílio das perforinas, as granzimas são interiorizadas às células alvos e clivam substratos críticos para iniciar a destruição do DNA e sucessiva morte celular. As granzimas mais abundantes são granzima A e B, elas induzem a morte celular rapidamente por vias alternativas que não se sobrepõem (FAN; ZANG, 2005).

A atuação da granzima A junto com a perforina induz a morte celular independente de caspase, apresentando alguns fatores de apoptose, tais como: condensação da cromatina, fragmentação nuclear, externalização de fosfatidil serina na membrana plasmática e perda do potencial transmembrana da mitocôndria (LIEBERMAN, 2003). Outros relatos indicam que granzima A pode ativar macrófagos a secretar citocinas e provavelmente atuar na degradação de proteínas extracelulares da matriz celular, que pode ocasionar a destruição tecidual (SOWER et al., 1996). Granzima A também pode estar envolvida na progressão de lesões em pacientes com leishmaniose. Foi observado que pacientes com LC em estágio tardio

expressam significativamente níveis mais elevados de granzima A do que pacientes em estágio inicial. A expressão de granzima A é evidente em pacientes com LC e é mais abundante em lesões de pacientes com a forma clínica mais grave, a LM, sugerindo assim a relevância do papel dessa molécula citotóxica na progressão da lesão e destruição tecidual em humanos (FARIA et al., 2005; FARIA et al., 2009).

Desta forma, estudos que venham a compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na LM são de extrema importância, visto que a resposta inflamatória não modulada pode estar relacionada à destruição grave do tecido.

1.7 Tratamento da leishmaniose

Desde o início do século 20, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a administração de antimonial para o tratamento da leishmaniose. Porém, distintas orientações terapêuticas existem em diferentes países e regiões do mundo, que sugerem a complexidade da abordagem terapêutica na leishmaniose. Uma vez que estamos diante de um aumento da resistência aos medicamentos disponíveis em algumas regiões, uma discussão global é necessária para melhorar a utilização dos medicamentos disponíveis e no desenvolvimento de novas drogas (GOTO; LINDOSO, 2010). Além disso, há diferenças entre as várias espécies de *Leishmania*, suscetibilidade às drogas, manifestações da doença, bem como a variação da resposta imune do hospedeiro ou a propriedade farmacocinética das drogas que influencia na eficácia e escolha da terapia (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

O tratamento mais comumente descrito e recomendado como primeira escolha pela OMS para leishmaniose é baseado nos antimoniais. No entanto, em alguns países, a droga de escolha que tem sido utilizada no tratamento para leishmaniose é anfotericina B. A Pentamidina tem sido usada com sucesso para o tratamento de LC e LM em algumas regiões da América do Sul (GOTO; LINDOSO, 2010).

O Antimônio Pentavalente (Sb^V) está disponível em duas formas: antimoniato de meglumina, conhecido comercialmente como Glucantime® e estibogluconato de sódio, conhecido comercialmente como Pentostam®. Glucantime® foi desenvolvido em 1945 e é a droga mais comumente usada no Brasil (AMATO et al., 2008).

O antimonial pentavalente não pode ser administrado por via oral; a OMS recomenda uma dose de 20mg/Kg ao dia com aplicação intramuscular ou intravenosa por 30 dias, podendo ocasionar em uma eventual hospitalização. O mecanismo de ação do antimonial não

é totalmente claro (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008), mas geralmente é aceito que todos os antimoniais pentavalentes são pró-drogas que exigem a redução biológica para a forma trivalente (Sb^{III}) para a atividade leishmanicida (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Foi observado em modelo murino que a ação de Sb^V depende de alguns fatores, incluindo a participação das populações de linfócitos T e citocinas (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008). Portanto, sugere-se que a atividade de Sb^V possa eliminar os parasitos por mecanismos dependentes da resposta imune do hospedeiro. Os principais efeitos colaterais são artralgia e mialgia, porém efeitos colaterais graves podem ocorrer como a cardiotoxicidade ou insuficiência renal, principalmente em pacientes idosos (GROGL; THOMASON; FRANKE, 1992; GOTO; LINDOSO, 2010). Essa droga é considerada como satisfatória para o tratamento de LC. Em LM, a taxa de cura varia de 30-90% com antimoniais, dependendo do país e da dose utilizada. Também foram observados recorrência, longo curso de terapia e a necessidade de pesquisas com a administração de outros agentes antileishmanicidas associados ao Sb^V , para maior eficácia no tratamento de LM (FRANKE et al., 1990; ROMERO et al., 1998; AMATO et al., 2009).

No Brasil, anfotericina B é a segunda droga de escolha para o tratamento de LM. Está comercialmente disponível em quatro formas: anfotericina B desoxicolato (Fungizon®), anfotericina lipossomal (AmBisome®), anfotericina dispersão colesterol (Anfocil®), anfotericina complexo lipídico (Abelcet®) (AMATO et al., 2008). Foi observado que o tratamento com anfotericina B ocasiona menor recorrência quando comparado ao tratamento com Sb^V , e inclusive, na maioria dos casos em que anfotericina B foi escolhida, isto ocorreu apenas devido à resistência às drogas antimoniais (BROWN et al., 2005; AMATO et al., 2008). A anfotericina B é considerada a droga mais eficaz no tratamento da LM, mas evita-se o seu uso devido ao seu principal efeito colateral que é insuficiência renal aguda (AMATO et al., 2009). O modo de ação dessa droga está associado à sua toxicidade: ela se liga ao ergosterol da membrana do parasito *Leishmania*, provocando sua morte, mas também em menor quantidade, liga-se ao colesterol humano. Além deste mecanismo, anfotericina B tem efeitos imunomoduladores. O uso de formulações lipídicas permite a redução dos efeitos tóxicos e torna possível a infusão de doses mais elevadas. Entretanto, essas formulações são relativamente caras e, portanto, fora do alcance de pacientes em áreas endêmicas. As doses adequadas ainda não foram determinadas, além da variabilidade conforme a formulação. A via de administração de todas as formulações de anfotericina B existentes é parenteral, isto ocasiona uma possível internação ou várias visitas clínicas. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para melhorar o uso de anfotericina B; de particular importância são as

tentativas de produzir derivados para o tratamento oral, que diminuirá os custos de internação e facilitará a administração em crianças e idosos (GOLENSER; DOMB, 2006).

Pentamidina é utilizada com sucesso no tratamento de LM. Essa droga interfere na síntese do DNA do parasito, provavelmente modificando a morfologia do cinetoplasto e induzindo a fragmentação da membrana mitocondrial, levando à morte do parasito (AMATO et al., 2008). Os principais efeitos adversos de Pentamidina são: hipo e hiperglicemia (GOTO; LINDOSO, 2010).

Nas últimas duas décadas, mais atenção tem sido dedicada para a pesquisa de drogas com via de administração oral. Uma dessas drogas é a Miltefosina, um composto anticâncer usado no tratamento de LV (MACHADO et al., 2010). Há poucos relatos deste tratamento para leishmaniose tegumentar (GOTO; LINDOSO, 2010). A eficácia clínica de Miltefosina para LC difere entre espécies de *Leishmania* e também entre as mesmas espécies de distintas áreas endêmicas. Miltefosina apresenta efeitos colaterais como náuseas, vômito e dor abdominal em pacientes com LC (MACHADO et al., 2010).

Azóis são inicialmente designados para tratar infecções fúngicas, mas também são utilizados para o tratamento de leishmaniose tegumentar. Pesquisadores têm investigado a eficácia de componentes azóis no tratamento de LC. Esses componentes antifúngicos incluem duas diferentes classes: imidazólicos (cetoconazol) e triazólicos (fluconazol, itraconazol). Eles apresentam o mesmo espectro antifúngico e mecanismo de ação, mas os triazólicos são metabolizados mais lentamente e são menos tóxicos que os imidazólicos (MORELLI et al., 2004). Uma grande vantagem destes compostos é que eles podem ser administrados por via oral e o perfil dos efeitos colaterais é consideravelmente menos tóxico, comparado com dos antimoniais pentavalentes. Parece que o cetoconazol oral pode ser eficaz no tratamento da leishmaniose na forma clínica mais branda, a LC. Não há estudos sobre o uso de triazóis para o tratamento de LC e, portanto, esses agentes não podem, atualmente, ser recomendados (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Paromomicina também é conhecido como aminosidina, um aminoglicosídeo usado no tratamento para LC (KHATAMI et al., 2007). É comercializado como uma droga oral antiparasitária e como agente antileishmaniose tópico. Paramomicina injetável foi experimentalmente utilizado para o tratamento de LV e, em geral a aplicação local é para o tratamento de LC (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). A pomada paramomicina foi considerada uma grande conquista devido ao seu custo relativamente baixo e de fácil aplicação, o que elimina a necessidade de injeção (KHATAMI et al., 2007).

Azitromicina apresenta atividade no tratamento da leishmaniose, mas os mecanismos de ação não são conhecidos. Estudos demonstram que a taxa de cura foi de 85% dos pacientes com LC infectados por *L. braziliensis* tratados com Azitromicina. A eficácia dessa droga sugere que esse medicamento pode ser uma boa opção terapêutica para o tratamento de LC causada por *L. braziliensis*, especialmente considerando-se a relação custo-benefício e o fato de que a medicação é de fácil administração, por via oral e dose única diária. No entanto, é necessário realizar mais estudos a fim de determinar o sucesso desse tratamento. Tanto em relação aos pacientes que apresentam a forma clínica mucosa, como a infecção por demais espécies de parasitos (PRATA et al., 2003).

Alopurinol isoladamente ou em associação com antimoniais é utilizado para tratar a leishmaniose. A droga não foi eficaz quando utilizada isoladamente (VELEZ et al., 1997); além disso, em associação com doses baixas de antimoniais, o tratamento obteve resultados semelhantes aos obtidos com apenas Sb^V (LLANOS-CUENTAS et al., 1997).

Vários outros medicamentos, como Dapsona, Rifampicina, Cloroquina e Nifurtimox foram propostos como alternativas de tratamento para leishmaniose. No entanto, a aplicação destes não é amplamente aceita, uma vez que a eficácia do tratamento não é convincente e a experiência com a utilização é limitada (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

A Organização Mundial da Saúde classificou a leishmaniose como uma das principais doenças tropicais. Uma vacina eficaz não está disponível e a quimioterapia é a única forma eficaz de tratar todas as formas da doença (EL-ON, 2009; MODABBER, 2010; MONZOTE, 2011). Atualmente a terapia é tóxica, de alto custo, e a resistência emergiu como um problema grave, que obrigou a busca de novos agentes antileishmanicidas. Diante deste contexto, um esforço considerável tem sido dedicado ao desenvolvimento de vacinas, mas este mercado é limitado, uma vez que o custo atual de desenvolvimento de uma vacina foi estimado em centenas de milhões de dólares e o financiamento para o desenvolvimento da vacina humana é mínimo (MODABBER, 2010; MONZOTE, 2011). Pesquisadores demonstraram resultados promissores, mas diante do tratamento com antimoniais, a imunoterapia é menos eficiente e mais prolongada. Entretanto, pode ser utilizada quando antimoniais são contra-indicados ou são considerados ineficazes (MAYRINK et al., 1992; HERNÁNDEZ et al., 2006; COLER et al., 2007). Pesquisadores revisaram avanços de drogas antileishmanicidas e analisaram patentes de 01/1969 a 12/2009, que foram classificadas como vacinas, imunomoduladores e drogas. Entre elas, o percentual maior foi atingido pelas drogas, representando 68% das patentes. Neste momento, o cenário da quimioterapia na leishmaniose é mais promissor do

que nunca. No entanto, os avanços na compreensão dos caminhos metabólicos e novos alvos de drogas, poderiam oferecer novas alternativas para o tratamento da leishmaniose (MONZOTE, 2011).

A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por *Leishmania*, faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para o controle e a prevenção da leishmaniose. O uso de citocinas ou de seus bloqueadores na leishmaniose foram estudados em vários ensaios clínicos, em função da imunopatogênese da doença e das dificuldades com uso convencional do antimonial pentavalente. O fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) foi utilizado como terapia adjuvante ao antimonial (ALMEIDA; BRITO; MACHADO, 2005). O GM-CSF é uma proteína produzida pelas células T ativadas, por macrófagos, células endoteliais e células estromais da medula óssea que atuam sobre os progenitores da medula óssea para aumentar a produção dos leucócitos inflamatórios (LIESCHKE; BURGESS, 1992). Estudos demonstram que pacientes tratados com GM-CSF e Sb^V foram curados mais rapidamente do que pacientes tratados somente com Sb^V (ALMEIDA et al., 1999). Inclusive a aplicação tópica de GM-CSF como adjuvante à terapia antimonial, demonstrado por Santos e colaboradores (2004), apresentou redução do tempo de cura no tratamento de pacientes com LC. Além disso, um estudo obteve êxito ao utilizar GM-CSF associado à imunoterápicos para o tratamento de pacientes com LM, que apresentaram uma história de falha terapêutica do uso de antimonial (BADARO et al., 2006).

A pentoxifilina (Ptx), conhecida comercialmente como Tentral[®] é utilizada e desenvolvida para o tratamento de doença vascular periférica, é capaz de agir em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos e neutrófilos. Entre as principais ações celulares determinadas por essa droga, consta a modulação da produção de citocinas. Ptx pode inibir a síntese de TNF- α por macrófagos murinos (LIN et al., 2004) e a síntese de IFN- γ (LUNA et al., 2011). Estas observações indicam que Ptx age por estimular alterações nas respostas celulares tipo Th1 e Th2 (DE SÁ OLIVEIRA et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que Ptx apresenta efeitos benéficos promissores. Luna e colaboradores (2011) observaram que Ptx inibiu a síntese de TNF- α e IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com HTLV-1 (*Human T lymphotropic virus type 1*). Este vírus induz um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias por células T, ocasionando uma destruição tecidual nas doenças relacionadas ao HTLV-1. Asvadi e colaboradores (2011) observaram que Ptx pode proporcionar proteção renal aos pacientes que desenvolvem

nefrotoxicidade como efeito colateral de tratamento tóxico, uma vez que Ptx pode agir como antiinflamatório e antioxidante. Já Thair e colaboradores (2011) desenvolveram ensaios clínicos randomizados, sugerindo que Ptx pode tornar-se um novo caminho clínico na terapia de pacientes com cirrose hepática. A produção excessiva de TNF- α desempenha um papel importante na progressão desta doença e está associada ao aumento da mortalidade. Portanto a intervenção com Ptx pode melhorar a taxa de sobrevivência.

Pentoxifilina é utilizada em associação com antimoniais para tratar pacientes com LC e LM. Estudos demonstraram o uso de Ptx associado ao Sb^V, onde 09 dos 10 pacientes com LM apresentaram cura das lesões em 90 dias após a terapia com completa reepitelização do tecido. Os níveis de TNF- α antes da terapia foram de 776 \pm 342 pg/ml para 94 \pm 57 pg/mL em 60 dias após a terapia, concluiu-se que houve significativa redução do tempo de cura e evitou a necessidade de outros tratamentos com Sb^V (LESSA et al., 2001; MACHADO, et al., 2007). A detecção de altos níveis de TNF- α durante a doença ativa e a sua queda após o tratamento e cura também sugere que a produção excessiva dessa citocina seja um dos fatores associados à progressão da doença (DA-CRUZ et al., 1996). Desta forma, o uso de Ptx se torna atraente no tratamento da leishmaniose, pois apresenta baixo nível de toxicidade e um bom efeito supressor de TNF- α , que preserva a viabilidade das células. Pesquisadores sugerem que o uso de Ptx associado ao Sb^V, deve ser a terapia de escolha para o tratamento de LM, até mesmo para os pacientes que apresentam falha na terapia de Sb^V (RIBEIRO DE JESUS et al., 2008).

O emprego de terapias imunomoduladoras tem apresentado resultados interessantes, devido à redução das doses do antimônio e do tempo de cura. No entanto, os mecanismos celulares envolvidos com o sucesso desses tratamentos não são conhecidos. Compreender como agem essas drogas do ponto de vista celular é fundamental, uma vez que este conhecimento poderá inclusive nortear a busca de novas estratégias preventivas ou terapêuticas, que direcionem a resposta para um perfil de cura e resolução das lesões. Nossa **hipótese de trabalho** é que o sucesso da terapia de Ptx como adjuvante ao Sb^V esteja associado às alterações no sítio da lesão, influenciando nas funções das populações celulares que contribuirão para o processo de sua resolução. Esse trabalho pode abrir novos campos para a pesquisa na intervenção do tratamento alternativo da leishmaniose, o que poderia beneficiar pacientes com leishmaniose tegumentar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do uso de antimônio pentavalente (Sb^V) e pentoxiflina (Ptx), de forma isolada e associada, caracterizando comparativamente o infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com leishmaniose mucosa infectados por *Leishmania braziliensis*, pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx).

2.2 Objetivos específicos

Em lesões de pacientes com leishmaniose mucosa infectados por *Leishmania braziliensis*, pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx), propusemo-nos a:

- a) avaliar aspectos histopatológicos;
- b) avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório;
- c) avaliar a composição do infiltrado inflamatório, determinando o número de células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e macrófagos $CD68^+$;
- d) avaliar o número de células que expressam as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e a molécula citotóxica granzima A e suas fontes produtoras;
- e) avaliar se existe correlação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a frequência das populações celulares T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD68^+$, a expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e a molécula citotóxica granzima A;
- f) avaliar se existe correlação entre a frequência das populações celulares T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD68^+$ e a expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e a molécula citotóxica granzima A.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos pacientes

Os indivíduos que se voluntariaram para este estudo, foram selecionados na área endêmica para leishmaniose, Corte de Pedra, a aproximadamente 400 Km de Salvador, Bahia, local onde todas as amostras foram coletadas. O diagnóstico, cuidados clínicos e tratamento dos pacientes foram responsabilidade do Dr. Edgar Carvalho, do Hospital Edgar Santos (UFBA, Salvador, BA). O tratamento foi oferecido a todos os pacientes, independentemente de sua participação no projeto. Os critérios de seleção dos pacientes foram baseados em exames clínicos, sorológicos, reação de Montenegro e parasitológicos. Portadores de outras doenças parasitárias e/ou desordens imunológicas e mulheres grávidas foram excluídos do estudo. Para avaliar o que foi proposto no objetivo geral (comparação das características do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com leishmaniose mucosa antes e após os tratamentos com Sb^V e Sb^V associado a Ptx) foram coletadas amostras, por meio de biópsias, das lesões de dez pacientes que apresentavam a forma clínica mucosa. Cinco pacientes foram tratados com Sb^V e cinco com Sb^V associado à Ptx. Foram obtidas duas amostras de cada paciente para análise antes e após os tratamentos. Os dados clínicos dos pacientes envolvidos no estudo são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Características clínicas dos pacientes com LM avaliados neste estudo

Identificação	Data da coleta (Pós-tratamento)	Sexo	Idade (anos)	Cicatrização total (dias)	Tratamento
19913	20/11/09	Masculino	47	90	Sb ^V
20099	18/12/09	Masculino	45	60	Sb ^V
20166	08/01/10	Masculino	60	120	Sb ^V
19748	21/08/09	Masculino	30	ND	Sb ^V
18217	25/07/08	Feminino	37	30	Sb ^V
20651	09/04/10	Feminino	65	30	Sb ^V + Ptx
13418	26/10/07	Feminino	48	60	Sb ^V + Ptx
18621	10/10/08	Masculino	27	60	Sb ^V + Ptx
19795	02/10/09	Feminino	21	180	Sb ^V + Ptx
17948	15/02/08	Masculino	51	90	Sb ^V + Ptx

ND = Não determinado;

A coleta do material também foi realizada antes dos tratamentos.

3.2 Coleta do material e obtenção dos cortes

As lesões mucosas foram obtidas por excisão de fragmentos de aproximadamente 3 mm usando bisturi após aplicação de anestesia local. Após a coleta das amostras, retirou-se um pequeno fragmento para confirmação da infecção por *Leishmania braziliensis* através da técnica de PCR (realizado no Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Edgar Santos, UFBA). Outro fragmento era reservado para este estudo.

As amostras de pacientes com leishmaniose mucosa foram embebidas, por 30 minutos, em solução de sacarose 30% a 4°C. Logo após, as amostras foram transferidas para o meio de inclusão *Tissue-Tek* e imediatamente colocadas em gelo seco. Após aproximadamente 08 horas, as amostras foram transferidas para o *freezer* -80°C, onde permaneceram até o processamento. Fragmentos de 4-5µm obtidos no criostato foram colocados em lâminas siliconadas da marca *Micro Slides* (Empresa VWR Scientific) e fixados em acetona a 4°C por 10 minutos.

3.3 Coloração histológica

Para certificarmos da qualidade e preservação do tecido, um fragmento de cada corte foi submetido à coloração histológica por hematoxilina (Merck)/eosina (Vetec). Após a fixação com acetona (Merck), as lâminas foram submetidas a 05 banhos de água corrente por 03 minutos cada e, posteriormente, coradas com hematoxilina. Em seguida, as lâminas foram submetidas a 01 banho de água corrente por 15 minutos e, então, coradas com eosina. Foi realizada uma sequência de banhos com álcool (Synth) 70%, 80%, 85%, e 03 banhos com álcool (Synth) 95% para que os cortes fossem desidratados, retirando todo o resquício de água para posteriormente entrar em contato com o xilol. Em seguida, os cortes foram passados por 03 banhos de xilol (Synth) para diafanização (clareamento do tecido) e, finalmente, as lâminas foram montadas com *Entellan* (Merck).

3.4 Análises histopatológicas das imagens por Microscopia Óptica

As imagens foram obtidas por microscopia óptica utilizando-se câmera Q Color 3 – Olympus acoplada ao microscópio Olympus BX51 e o *software* Image Pro-express com objetiva no aumento de 40X. Foram capturados três a oito campos para cada lâmina. Os dados foram armazenados em CDs para serem analisados posteriormente. O processamento e análise

das imagens foram realizados utilizando o programa Image J (1.43 U). As células foram quantificadas, de acordo com morfologia dos núcleos, em três ou oito campos e, posteriormente, foi realizada a média por número de campos.

3.5 Reações de imunofluorescência

A imunofluorescência indireta para os marcadores intra e extracelulares (IFN- γ , IL-10, TNF- α , granzima A, CD4, CD8 e CD68) foi realizada utilizando cortes com 5 μ m de espessura em lâminas siliconadas da marca *Micro Slides* (Empresa VWR Scientific). Os anticorpos que foram utilizados neste estudo são apresentados no Quadro 2 e as combinações utilizadas em cada ensaio no Quadro 3.

Quadro 2 – Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência indireta

Anticorpos	Marca	Fluorocromo	Isotipo/clone	Diluição
IFN-γ	BDPharmingen	PE	IgG1,k/4S.B3	1:15
Granzima A	BDPharmingen	PE	IgG1/CB9	1:5
TNF-α	BDPharmingen	PE	IgG1,k/MAb11	1:10
IL-10	R&D	-	IgG1	1:40
Streptavidina	BDPharmingen	PE	Streptavidin/RPA-T4	1:70
CD4	Biosource	FITC	IgG2a/S3.5	1:5
CD8	Biosource	FITC	IgG2a/3B5	1:5
CD68	Caltag, Invitrogen	FITC	IgG1/GM4152	1:10
CI	Caltag BDPharmingen	PE FITC	IgG1/ICIGG1 IgG2a/X39	1:10 1:10

PE – Ficoeritrina;

FITC – Isotiacianato de fluoresceína;

CI – Controle de Isotipo.

Quadro 3 – Combinações de anticorpos utilizados para imunofluorescência indireta

Controles de isotipo FITC/PE
CD4 FITC / IFN-γ PE
CD8 FITC / Granzima A PE
CD68 FITC / TNF-α PE
CD68 FITC / IL-10 PE

Após a realização dos cortes em criostato e montagem das lâminas, foram realizadas as reações de imunofluorescência utilizando a metodologia semelhante à utilizada por Faria et al (2005). Os cortes para imunofluorescência foram submetidos a uma seqüência de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, em PBS. Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com PBS/BSA 3% durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados anticorpos monoclonais, para as citocinas, marcados com fluorocromo PE, diluídos em PBS/BSA 3%. Os cortes foram incubados *overnight* (\cong 15 horas) a 4°C. Posteriormente, foram realizadas seqüências de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, em PBS, e secagem de lâminas. Novamente os cortes foram incubados com PBS/BSA 3% durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário para amplificação do sinal com exceção das marcações com anticorpos biotiniliados que foram marcados com streptavidina PE, ambos diluídos em PBS/BSA 3% por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas seqüências de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, em PBS, e secagem de lâminas. Novamente os cortes foram incubados com PBS/BSA 3% durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo FITC, diluídos em PBS/BSA 3% por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas seqüências de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, em PBS, e secagem de lâminas. Novamente os cortes foram incubados com PBS/BSA 3% durante 30 minutos. Adicionou-se, então, DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* – SIGMA) diluído em PBS/BSA 3% durante 40 minutos e uma nova etapa de cinco banhos com duração de 3 minutos cada em PBS. As lâminas foram montadas com *Hydromount* (National Diagnostics) e permaneceram a 4°C, protegidas da luz, até o momento da aquisição no microscópio confocal a laser (Zeiss). Em uma lâmina de cada paciente foram feitos dois controles da reação para descartar a ligação inespecífica do anticorpo primário e secundário. No primeiro controle, um corte foi incubado com CI (*overnight* a 4°C), seguido de 05 banhos com duração de 3 minutos cada e adicionado o anticorpo secundário. No segundo controle, um corte foi incubado com PBS/BSA 3%, e, em seguida foram realizadas seqüências de 05 banhos com duração de 3 minutos cada e adicionado o anticorpo secundário.

3.6 Microscopia Confocal

As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Zeiss 510 META, Germany) utilizando o *software* LSM 510 acoplado a um microscópio Zeiss (Axiovert 200M) com objetiva de imersão em óleo (40X). O processamento e análise das imagens foram realizados

utilizando os programas Zeiss LSM Image Browser (Zeiss), Adobe Photoshop CS4 (11.0) e Image Tool (3.00). Os dados foram digitalizados e armazenados em CDs para posteriormente serem analisados. Foram capturados cinco ou três campos em microscopia confocal para cada lâmina utilizando comprimentos de onda específicos para FITC, PE e DAPI.

3.7 Análises das imagens obtidas por Microscopia Confocal

Foram capturadas, aleatoriamente, cinco ou três imagens de cada indivíduo em microscópio confocal (Zeiss 510 META) com filtros específicos para FITC, PE e DAPI (Fig. 5). Os núcleos foram contados e a fluorescência foi quantificada utilizando-se *software* específico – Image Tool[®] 3.00.

Para determinação do número total de células, a quantificação foi realizada pela contagem dos núcleos que apresentaram fluorescência azul – DAPI (Fig. 5). As células foram contadas em cinco ou três campos e, posteriormente, foi realizada a média por número de campos.

Em relação à análise da expressão de cada marcador, as células que apresentaram fluorescência FITC ou PE foram quantificadas utilizando *software* específico – ImageTool[®] 3.00 (Fig. 3A e 3B). As células foram contadas em cinco ou três campos e posteriormente realizadas as médias por número de campos. Nas análises para dupla marcação, as células que apresentaram fluorescência FITC e PE simultaneamente foram quantificadas utilizando *software* específico – ImageTool 3.00 (Fig. 3C). Também foram analisados cinco ou três campos e calculada a média de células por campo. Os resultados foram expressos em forma de média e \pm desvio padrão do número de células em lesões de pacientes com a forma clínica mucosa.

Figura 3 – Imagem representativa de análise por Microscopia Confocal para quantificação de populações celulares e expressão de citocinas e da molécula citotóxica granzima A presente em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

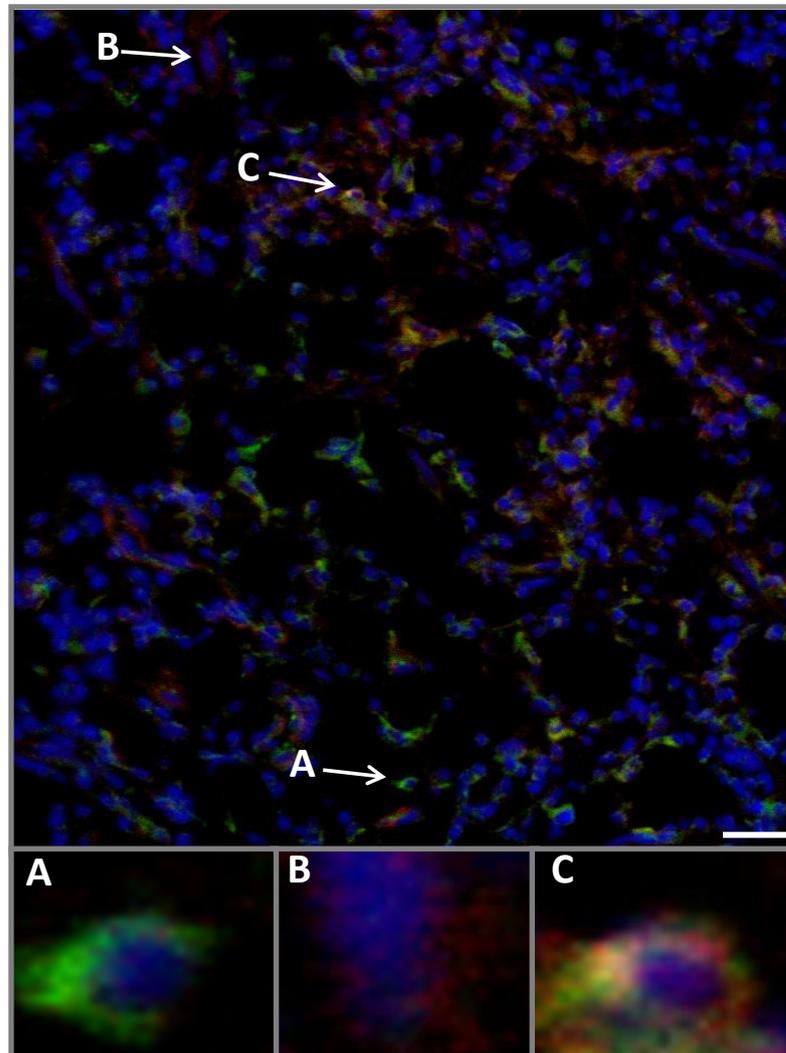


Figura 3: Quantificação celular realizada através dos núcleos que apresentaram fluorescência azul – DAPI. Célula $CD4^+$ marcada com anticorpo monoclonal anti- $CD4$ com fluorocromo FITC – fluorescência verde (A), célula $IFN-\gamma^+$ marcada com anti- $IFN-\gamma$ com fluorocromo PE – fluorescência vermelha (B) e célula $CD4^+IFN-\gamma^+$ que apresenta sobreposição das fluorescências verde e vermelha (C). Barra: $10\mu m$.

3.8 Análise estatística

Após a obtenção dos resultados individuais, médias, desvios e erros-padrões, os testes de análise de variância paramétrico Teste T e não-paramétrico Wilcoxon (*software* GraphPad Prism 4) foram aplicados a fim de verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Test T pareado foi utilizado quando compararam-se resultados obtidos dos mesmos pacientes antes e após seu tratamento e Wilcoxon foi utilizado quando compararam-se resultados obtidos nas análises dos diferentes tratamentos (pacientes distintos). Análises de correlação foram estabelecidas entre diferentes parâmetros, utilizando o coeficiente de correlação Spearman do programa estatístico JMP (*software* SAS). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

4.1.1 Análise histopatológica em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Utilizando cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, verificamos que, antes dos tratamentos, as lesões apresentaram tecido epitelial estratificado pavimentoso com presença de acantose e degeneração hidrópica na camada espinhosa. Observamos também a presença de tecido conjuntivo denso do tipo produtivo com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Fig. 4A). O mesmo foi observado ao analisarmos lesões pós-tratamento com Sb^V, entretanto o tecido conjuntivo apresentou-se mais vascularizado e com maior frequência de células polimorfonucleares (Tab. 1) (Fig. 4B). Já as lesões pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, observamos a presença de queratina e o tecido conjuntivo apresentou infiltrado inflamatório exsudativo difuso predominantemente mononuclear (Fig. 4C).

Tabela 1 – Número total de células inflamatórias por campo e frequências de células mononucleares e polimorfonucleares em lesões de pacientes com LM pré e pós tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Parâmetros	Tratamento com Sb ^V			Tratamento com Sb ^V +Ptx		
	Pré	Pós	P	Pré	Pós	P
Nº total células/campo	92,3	57,3	0,06	63,3	45,4	0,14
% Células mononucleares	99,1	98,3	0,07	98,2	98,7	0,21
% Células polimorfonucleares	0,9	1,8	0,04*	1,8	1,3	0,21

Quantificação celular de secções de lesões coradas com hematoxilina e eosina; pré e pós-tratamentos com Sb^V (antimônio pentavalente) e Sb^V+Ptx (antimônio pentavalente associado à pentoxifilina).

Figura 4 – Cortes de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx corados com hematoxilina e eosina (HE)

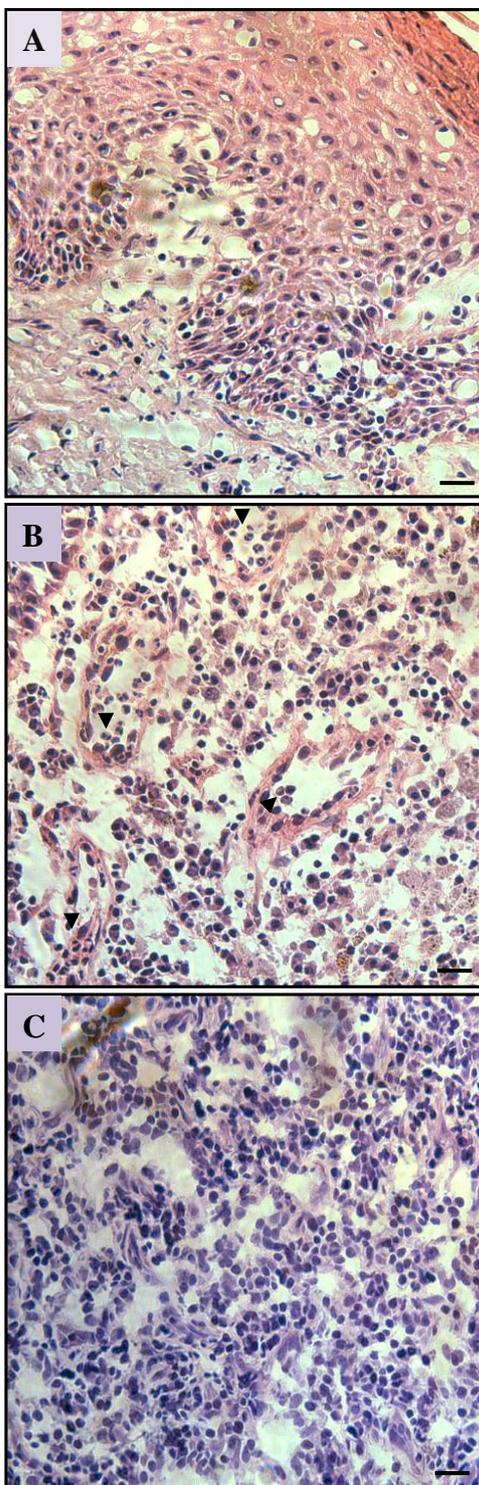


Figura 4: Corte de lesão de paciente com LM pré-tratamento (A). Corte de lesão de paciente com LM pós-tratamento com Sb^V, setas indicam neutrófilos (B). Corte de lesão de paciente com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (C). Aumento: 400X. Barra: 10µm.

4.1.2 Análise comparativa do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Por meio de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, verificou-se a presença do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx. Com o objetivo de avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório, a análise foi realizada por quantificação celular, como descrito em Materiais e Métodos. Desta forma, verificou-se um infiltrado inflamatório semelhante e predominantemente mononuclear em pré e pós-tratamentos (Fig. 5A e 5B) e quando comparados os diferentes tratamentos (Fig. 5C).

Figura 5 – Análise comparativa do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

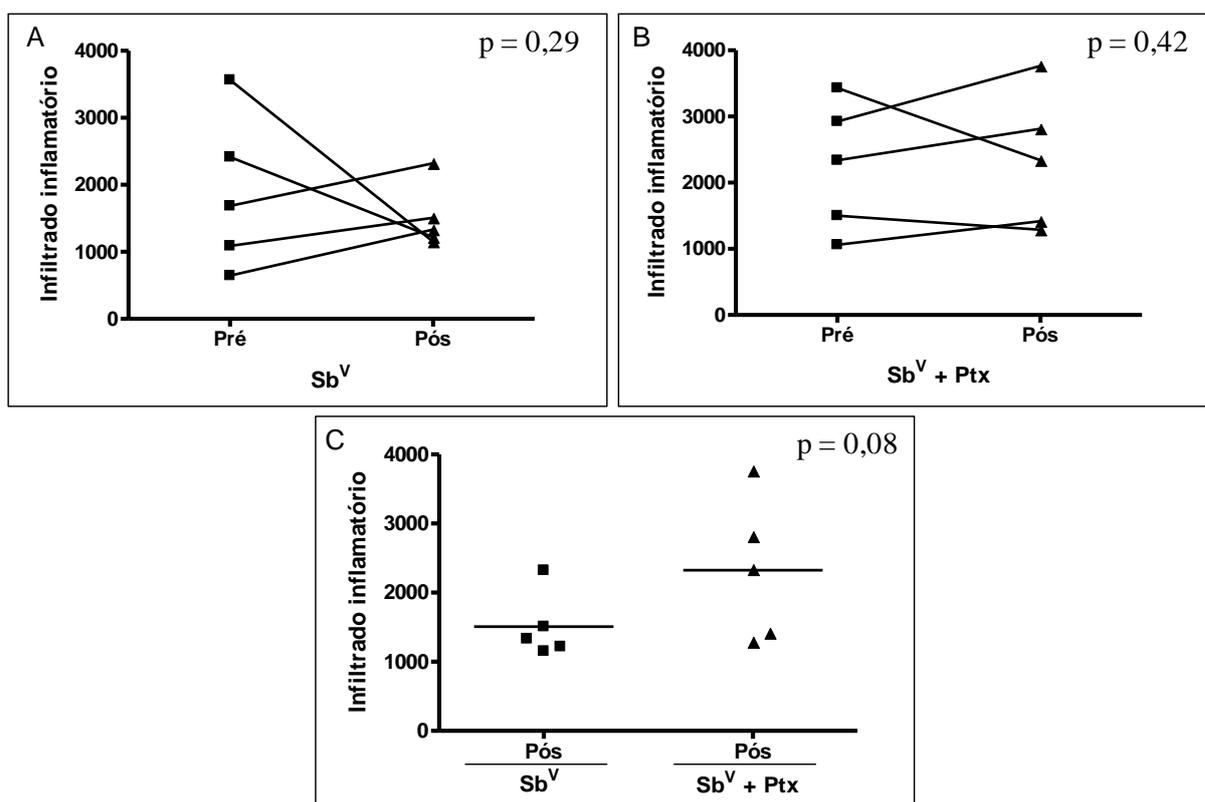


Figura 5: Análise comparativa do infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B); e entre os tratamentos (C).

4.1.3 Análise comparativa da frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD68⁺ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

A composição do infiltrado inflamatório foi determinada por Microscopia Confocal, como descrito em Materiais e Métodos. A frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos CD68⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamento com Sb^V não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Fig. 6A). Entretanto, a frequência de macrófagos CD68⁺ foi significativamente menor em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (Fig. 6B e 6D), quando comparado às lesões de pacientes pré-tratamento (Fig. 6B e 6C). O mesmo não foi observado quando analisamos a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Fig. 6B). Não houve diferença estatisticamente significativa das populações celulares quando comparados os diferentes tratamentos (dados não mostrados).

Figura 6 – Análise comparativa da frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD68⁺ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

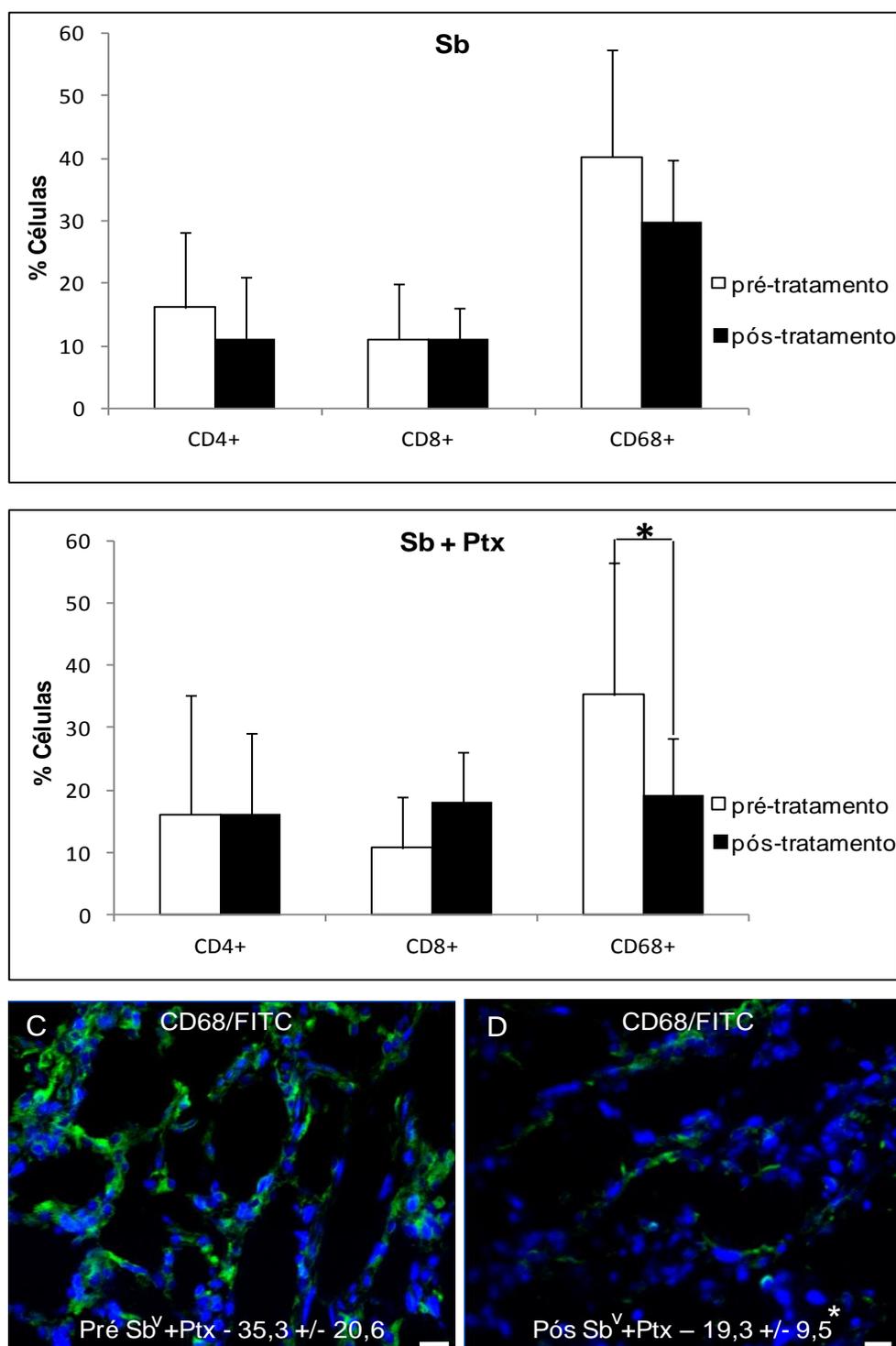


Figura 6: Análise comparativa da frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD68⁺ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B). Imagem representativa de microscopia confocal para análise da determinação da frequência de células CD68⁺ pré (C) e pós-tratamento (D) com Sb^V associado à Ptx. Cortes de tecidos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-CD68 com fluorocromo FITC – fluorescência verde – e DAPI para núcleos celulares – fluorescência azul – conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores são a média e o desvio padrão para cada grupo seguindo a determinação da frequência de células positivas para CD68. Barra: 10µm.

4.2 Expressão das diferentes citocinas e molécula citotóxica granzima A em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

4.2.1 Análise comparativa do número de células expressando IFN- γ e CD4⁺IFN- γ ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Com o objetivo de verificar se os tratamentos alteram a expressão de IFN- γ no sítio da lesão, analisou-se o número de células IFN- γ ⁺. Verificou-se que as lesões de pacientes com LM apresentaram um número semelhante de células que expressam IFN- γ em pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx (Fig. 7A e 7B). Esta semelhança também foi observada quando comparamos os dois tipos de tratamentos (Fig. 7E). Com o objetivo de determinar a contribuição das células T CD4⁺ para a produção de IFN- γ , determinou-se o número de células CD4⁺IFN- γ ⁺ em lesões pré e pós-tratamentos. Não houve diferença na frequência destas células comparando-se pré e pós-tratamentos (Fig. 7C e 7D) ou comparando-se entre os tratamentos (Fig. 7F). Observou-se que as células T CD4⁺ são responsáveis por aproximadamente 62% da expressão de IFN- γ tanto antes como após o tratamento com Sb^V associado à Ptx (Tab. 2). Eliminando-se a contribuição de células T CD4⁺ para a expressão de IFN- γ , observou-se que aproximadamente 38% desta citocina é proveniente de outras populações celulares (Tab. 2). De forma interessante, observou-se aumento da expressão de IFN- γ ⁺ por outras sub-populações celulares em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V, quando comparado com as lesões dos pacientes pré-tratamento (Tab. 2).

Figura 7 – Análise comparativa do número de células IFN- γ^+ e CD4⁺IFN- γ^+ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

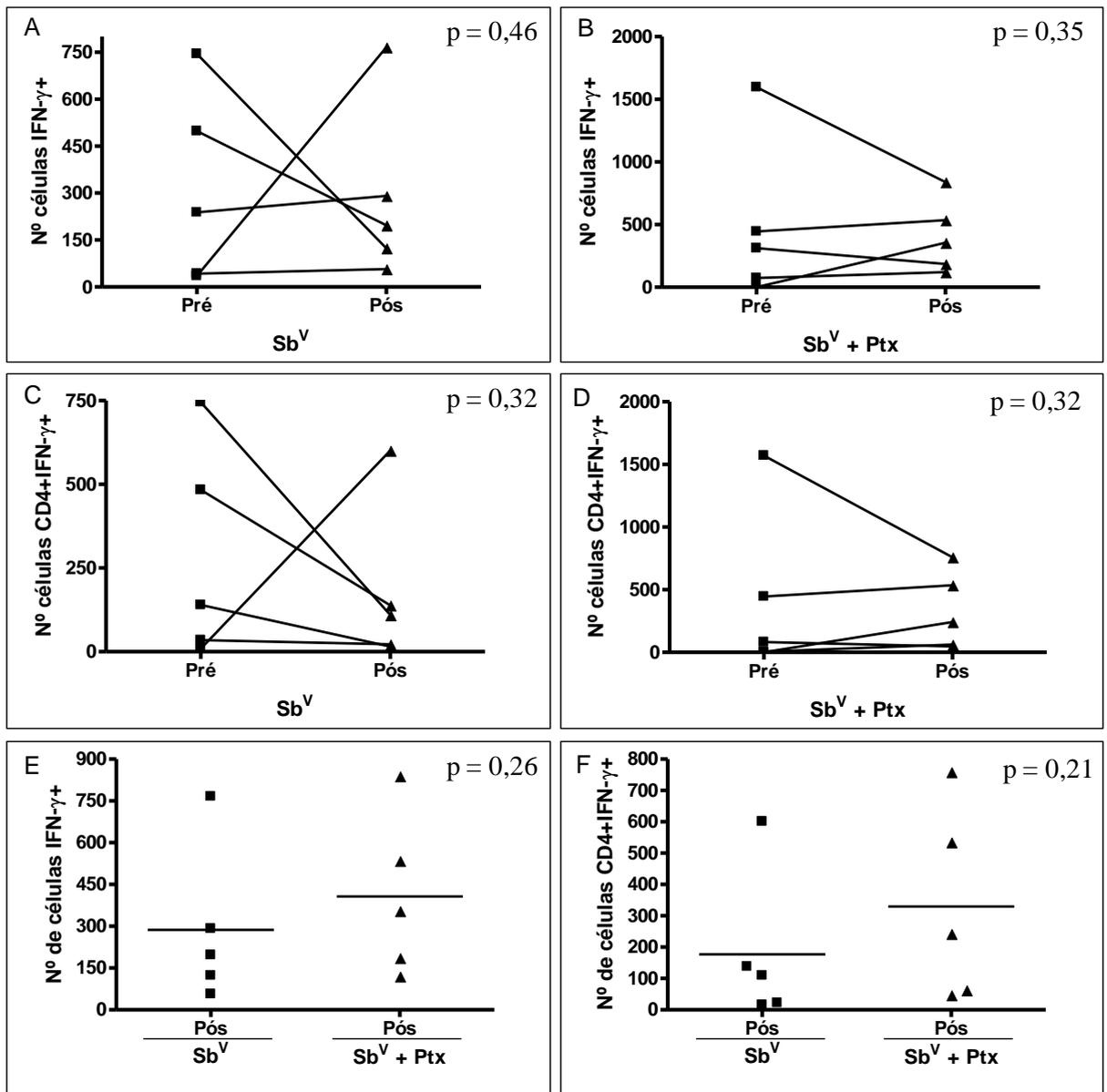


Figura 7: Análise do número de células IFN- γ^+ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (A), Sb^V associado à Ptx (B) e entre os tratamentos (E). Análise do número de células CD4⁺IFN- γ^+ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (C), Sb^V associado à Ptx (D) e entre os tratamentos (F).

Tabela 2 – Quantificação de células IFN- γ^+ e contribuição de células T CD4 $^+$ para a produção desta citocina em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb V e Sb V associado à Ptx)

Parâmetros	Tratamento com Sb V			Tratamento com Sb V + Ptx		
	Pré	Pós	<i>P</i>	Pré	Pós	<i>P</i>
IFN- γ^+	311,8 \pm 307,0	286,9 \pm 281,8	0,46	486,2 \pm 646,8	407,1 \pm 289,9	0,35
CD4 $^+$ IFN- γ^+	282,4 \pm 320,5	177,3 \pm 242,7	0,32	421,2 \pm 668,6	329,4 \pm 310,3	0,32
%IFN- γ^+ produzido por CD4 $^+$ (a)	72,8 \pm 30,7	56,4 \pm 33,9	0,21	58,0 \pm 48,2	67,3 \pm 30,0	0,12
%IFN- γ^+ produzido por CD4 $^+$ (b)	27,2 \pm 30,7	43,6 \pm 33,9	0,21	42,0 \pm 48,2	32,7 \pm 30,0	0,47

Média da quantificação baseada na expressão de fluorescência específica para IFN- γ e CD4, como descrito em Materiais e Métodos;

^a Porcentagem calculada de células T CD4 $^+$ expressando IFN- γ em relação à expressão total desta citocina;

^b Porcentagem calculada de células T CD4 $^+$ expressando IFN- γ em relação a expressão total desta citocina.

4.2.2 Análise comparativa do número de células expressando TNF- α e CD68⁺TNF- α ⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Com a finalidade de verificarmos os efeitos dos diferentes tratamentos na expressão de TNF- α , analisamos o número de células TNF- α ⁺. Verificou-se que as lesões de pacientes com LM apresentaram um número semelhante de células que expressam TNF- α em pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx (Fig. 8A e 8B). Esta semelhança também foi observada quando comparamos os dois tipos de tratamentos (Fig. 8E). Além disso, a presença de macrófagos CD68⁺ que expressam TNF- α também foi avaliada, e, não foi observada diferença entre o número de células CD68⁺TNF- α ⁺ pré e pós-tratamento com Sb^V (Fig. 8C). No entanto, observou-se menor número de células CD68⁺TNF- α ⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (Fig. 8D, 8H e Tab. 3), quando comparado às lesões de pacientes pré-tratamento (Fig. 9D e 9G). Porém, o mesmo não foi observado quando analisado entre os diferentes tratamentos (Fig. 8F). Observou-se que as células CD68⁺ são responsáveis por aproximadamente 65% da expressão de TNF- α tanto antes como após o tratamento com Sb^V (Tab. 3). Eliminando-se a contribuição de células CD68⁺ para a expressão de TNF- α , observou-se que aproximadamente 35% desta citocina é proveniente de outras populações celulares (Tab. 3). Ao analisarmos lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado a Ptx, observamos um aumento da expressão de TNF- α ⁺ por outras sub-populações celulares, quando comparado com as lesões dos pacientes pré-tratamento (Tab. 3).

Figura 8 – Análise comparativa do número de células $TNF-\alpha^+$ e $CD68^+TNF-\alpha^+$ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V associado à Ptx

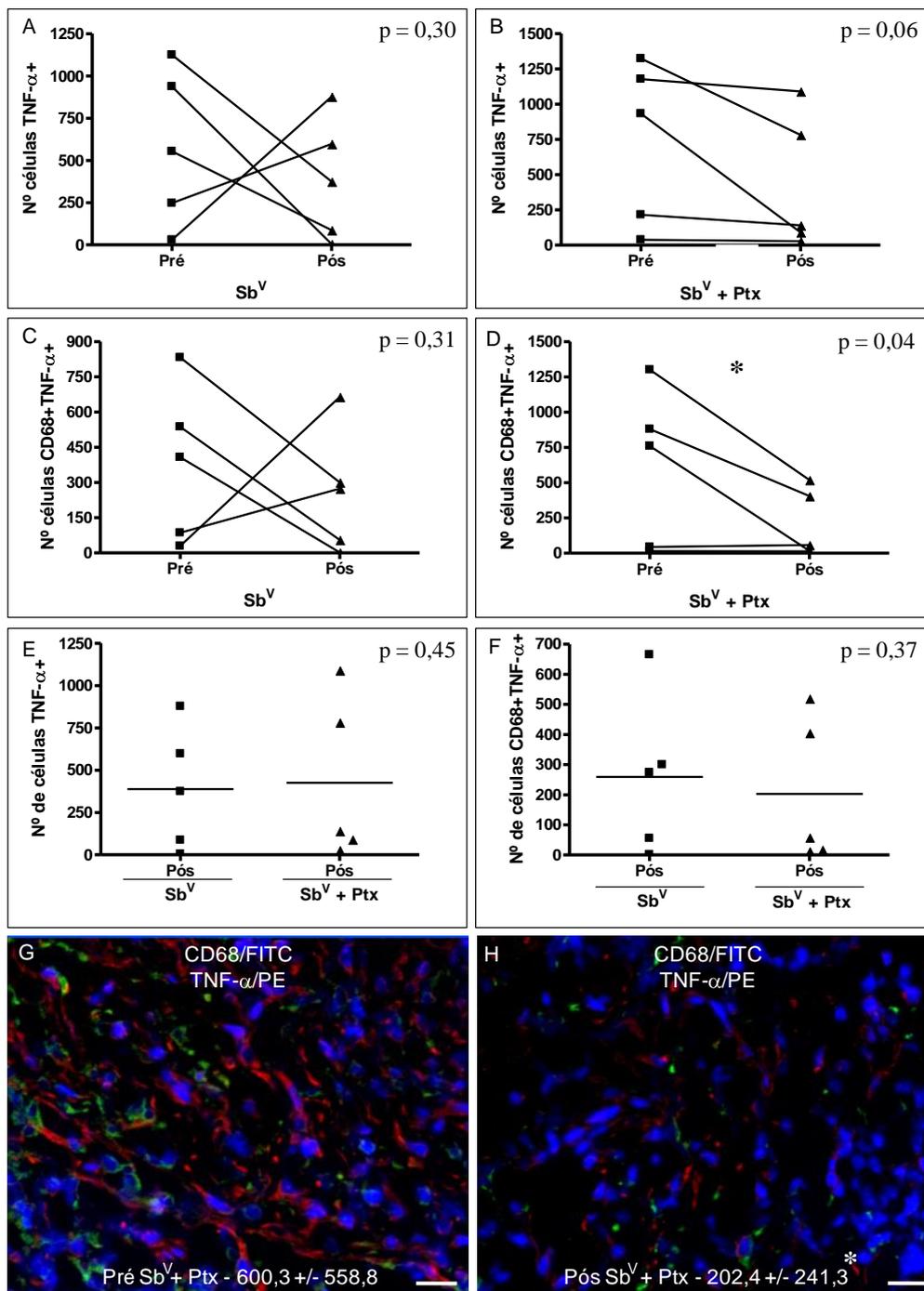


Figura 8: Análise do número de células $TNF-\alpha^+$ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (A), Sb^V associado à Ptx (B) e entre os tratamentos (E). Análise do número de células $CD68^+TNF-\alpha^+$ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (C), Sb^V associado à Ptx (D) e entre os tratamentos (F). Imagem representativa de microscopia confocal para análise da determinação do número de células $CD68^+TNF-\alpha^+$ pré (G) e pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (H). Cortes de tecidos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-CD68 com fluorocromo FITC – fluorescência verde –; anti- $TNF-\alpha^+$ com fluorocromo PE – fluorescência vermelha – e DAPI para núcleos celulares – fluorescência azul – conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores são a média e o desvio padrão para cada grupo seguindo a determinação do número de células positivas para CD68 e $TNF-\alpha$. Barra: 10 μ m.

Tabela 3 – Quantificação de células TNF- α^+ e contribuição de células CD68 $^+$ para a produção desta citocina em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb V e Sb V associado à Ptx)

Parâmetros	Sb V			Sb V + Ptx		
	Pré	Pós	<i>P</i>	Pré	Pós	<i>P</i>
TNF- α^+	578,2 \pm 457,8	388,3 \pm 361,0	0,30	737,8 \pm 578,5	425,9 \pm 479,6	0,06
CD68 $^+$ TNF- α^+	378,6 \pm 331,7	259,1 \pm 262,0	0,31	600,3 \pm 558,8	202,4 \pm 241,3	0,04*
%TNF- α^+ produzido por CD68 $^+$ (a)	69,9 \pm 30,0	59,4 \pm 20,3	0,14	62,7 \pm 32,2	41,8 \pm 17,1	0,12
%TNF- α^+ produzido por CD68 $^-$ (b)	30,1 \pm 30,0	40,6 \pm 20,3	0,14	37,3 \pm 32,2	58,2 \pm 17,1	0,12

Média da quantificação baseada na expressão de fluorescência específica para TNF- α e CD68, como descrito em Materiais e Métodos;

^a Porcentagem calculada de células CD68 $^+$ expressando TNF- α em relação à expressão total desta citocina;

^b Porcentagem calculada de células CD68 $^-$ expressando TNF- α em relação a expressão total desta citocina.

4.2.3 Análise comparativa do número de células expressando IL-10 e CD68⁺IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Verificou-se que as lesões de pacientes com LM apresentaram um número semelhante de células que expressam IL-10 em pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx (Fig. 9A e 9B). Esta semelhança também foi observada quando comparamos os dois tipos de tratamentos (Fig. 9E). Além disso, a presença de células CD68⁺ que expressam IL-10 também foi avaliada, e, não foi observada diferença entre o número de células CD68⁺IL-10⁺ pré e pós-tratamentos (Fig. 9C e 9D) e quando compararam-se os diferentes tratamentos (Fig. 9F). Observou-se que as células CD68⁺ são responsáveis por aproximadamente 77% da expressão de IL-10 tanto antes como após o tratamento com Sb^V (Tab. 4). Eliminando-se a contribuição de células CD68⁺ para a expressão de IL-10, observou-se que aproximadamente 23% desta citocina é proveniente de outras populações celulares (Tab. 4). Ao analisarmos lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado a Ptx, observamos um aumento da expressão de IL-10⁺ por outras sub-populações celulares, quando comparado com as lesões dos pacientes pré-tratamento (Tab. 4).

Figura 9 – Análise comparativa do número de células IL-10⁺ e CD68⁺IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

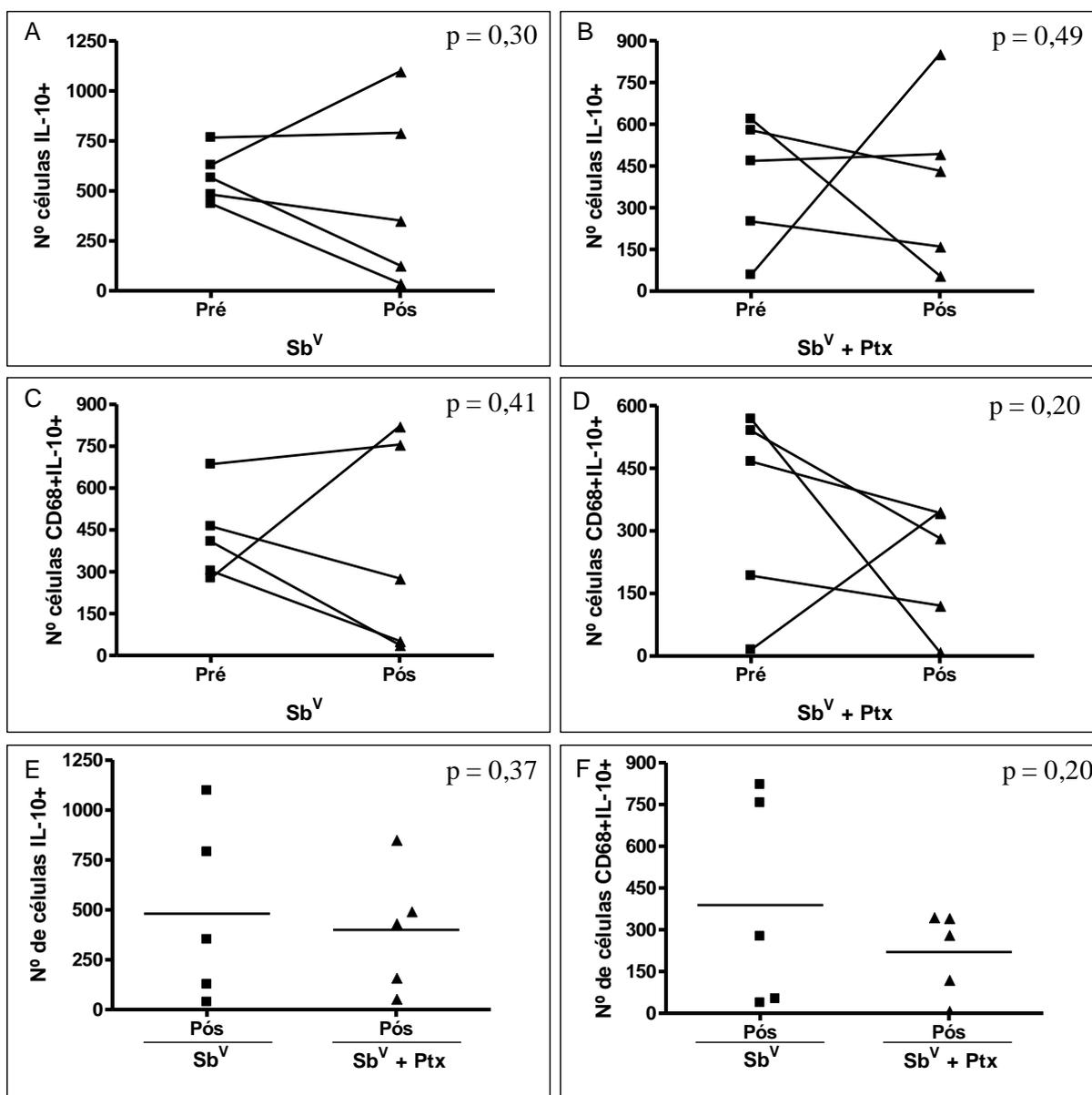


Figura 9: Análise do número de células IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (A), Sb^V associado à Ptx (B) e entre os tratamentos (E). Análise do número de células CD68⁺IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (C), Sb^V associado à Ptx (D) e entre os tratamentos (F).

Tabela 4 – Quantificação de células IL-10⁺ e contribuição de células CD68⁺ para a produção desta citocina em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Parâmetros	Sb ^V			Sb ^V + Ptx		
	Pré	Pós	<i>P</i>	Pré	Pós	<i>P</i>
IL-10⁺	575,4 ± 129,9	480,9 ± 451,1	0,30	395,1 ± 236,2	398,9 ± 312,2	0,49
CD68⁺ IL-10⁺	427,4 ± 163,2	388,8 ± 378,0	0,41	356,4 ± 241,9	220,5 ± 149,1	0,20
%IL-10⁺ produzido Por CD68⁺ (a)	75,4 ± 24,6	78,0 ± 23,4	0,39	77,4 ± 30,2	53,6 ± 24,2	0,10
%IL-10⁺ produzido por CD68⁻ (b)	24,6 ± 24,6	22,0 ± 23,4	0,39	22,6 ± 30,2	46,4 ± 24,2	0,10

Média da quantificação baseada na expressão de fluorescência específica para IL-10 e CD68, como descrito em Materiais e Métodos;

^a Porcentagem calculada de células CD68⁺ expressando IL-10 em relação à expressão total desta citocina;

^b Porcentagem calculada de células CD68⁻ expressando IL-10 em relação a expressão total desta citocina.

4.2.4 Análise comparativa do número de células expressando granzima A e CD8⁺GrA⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Verificou-se que as lesões de pacientes com LM apresentaram um número semelhante de células que expressam granzima A em pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx (Fig. 10A e 10B). Esta semelhança também foi observada quando comparamos os dois tipos de tratamentos (Fig. 10E). Além disso, a presença de células T CD8⁺ que expressam granzima A também foi avaliada, e, não foi observada diferença entre o número de células CD8⁺GrA⁺ pré e pós-tratamentos (Fig. 10C e 10D) e quando compararam-se os diferentes tratamentos (Fig. 10F). Observou-se que as células T CD8⁺ são responsáveis por aproximadamente 70% da expressão de granzima A tanto antes como após os diferentes tratamentos (Tab. 5).

Figura 10 – Análise comparativa do número de células granzima A⁺ e CD8⁺GrA⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

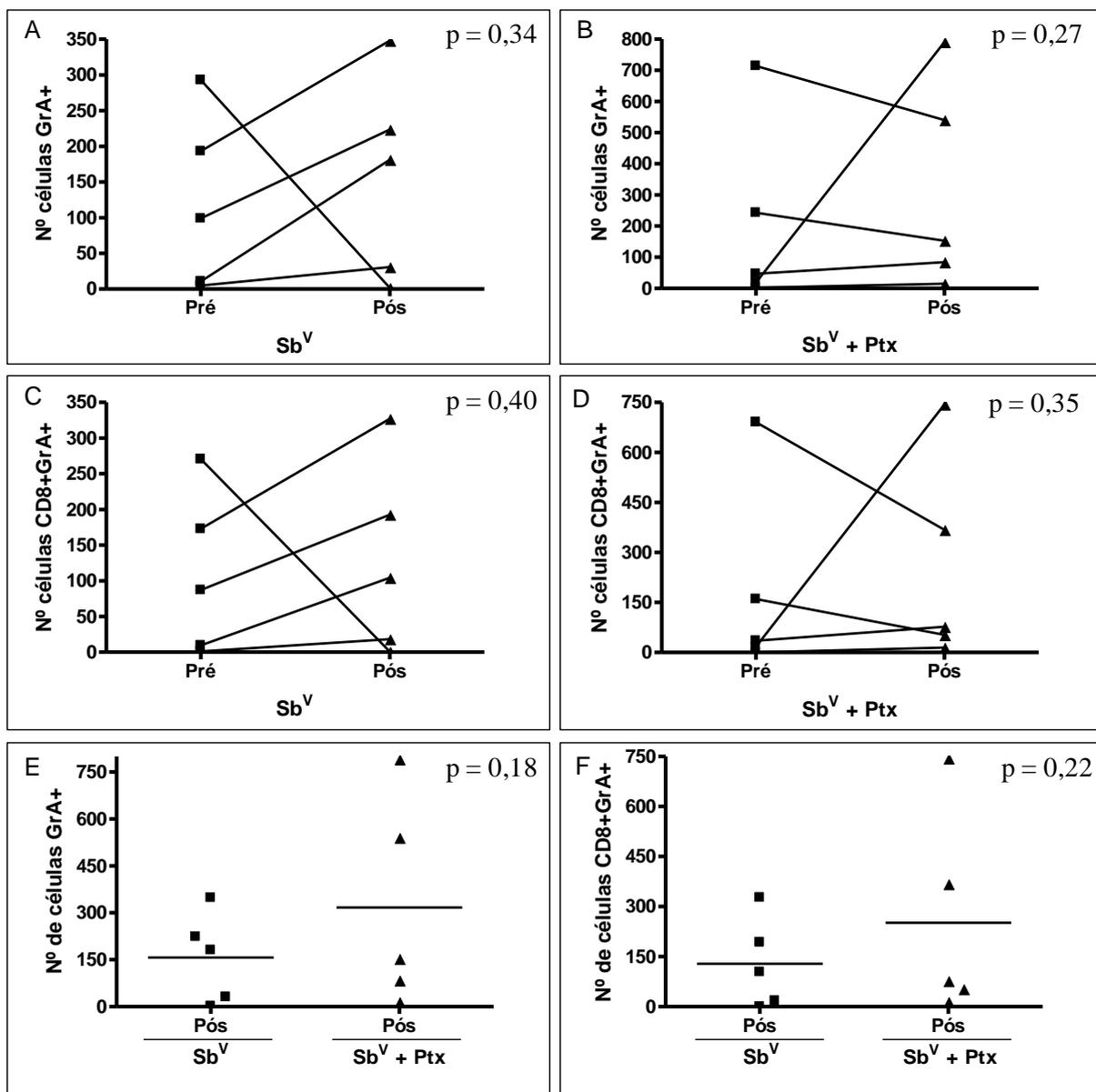


Figura 10: Análise do número de células granzima A⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (A), Sb^V associado à Ptx (B) e entre os tratamentos (E). Análise do número de células CD8⁺GrA⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V (C), Sb^V associado à Ptx (D) e entre os tratamentos (F).

Tabela 5 – Quantificação de células granzima A⁺ e contribuição de células T CD8⁺ para a produção desta molécula em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Parâmetros	Sb ^V			Sb ^V + Ptx		
	Pré	Pós	<i>P</i>	Pré	Pós	<i>P</i>
GrA⁺	120,2 ± 123,5	157,1 ± 142,8	0,34	204,8 ± 300,7	316,7 ± 334,3	0,27
CD8⁺GrA⁺	108,2 ± 114,3	128,5 ± 134,8	0,40	180,6 ± 292,0	251,4 ± 309,0	0,35
%GrA⁺ produzido Por CD8⁺ (a)	75,6 ± 32,4	66,7 ± 23,0	0,31	66,4 ± 39,3	77,4 ± 26,7	0,33
%GrA⁺ produzido por CD8⁻ (b)	24,4 ± 32,4	33,3 ± 23,0	0,31	33,6 ± 39,3	22,6 ± 26,7	0,33

Média da quantificação baseada na expressão de fluorescência específica para granzima A e CD8, como descrito em Materiais e Métodos;

^a Porcentagem calculada de células T CD8⁺ expressando granzima A em relação à expressão total desta citocina;

^b Porcentagem calculada de células T CD8⁻ expressando granzima A em relação a expressão total desta citocina.

4.3 Correlações entre o infiltrado inflamatório e populações celulares em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

4.3.1 Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD4⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Para determinar se o número de células T CD4⁺ está aumentando a medida que aumenta o infiltrado inflamatório, realizamos análises de correlação. Observou-se uma correlação positiva entre o número de células T CD4⁺ e o infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V (Fig. 11A). No entanto, esta correlação não é observada em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (Fig. 11B) e pré-tratamentos (dados não mostrados).

Figura 11 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD4⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

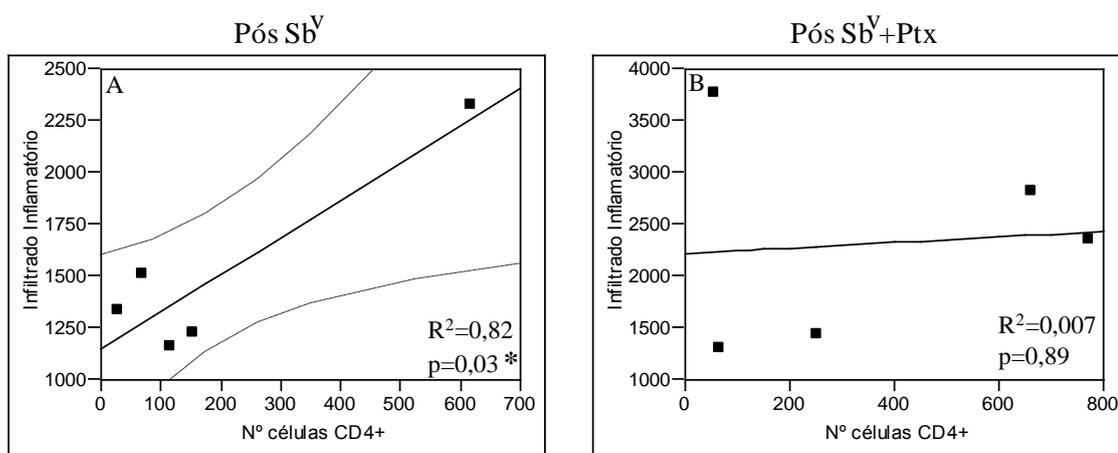


Figura 11: Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD4⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

4.3.2 Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Para determinar se o número de células T CD8⁺ está aumentando a medida que aumenta o infiltrado inflamatório, realizamos análises de correlação. Observou-se uma correlação positiva entre o número de células T CD8⁺ e o infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (Fig. 12B). No entanto, esta correlação não é observada em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V (Fig. 12A) e pré-tratamentos (dados não mostrados).

Figura 12 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

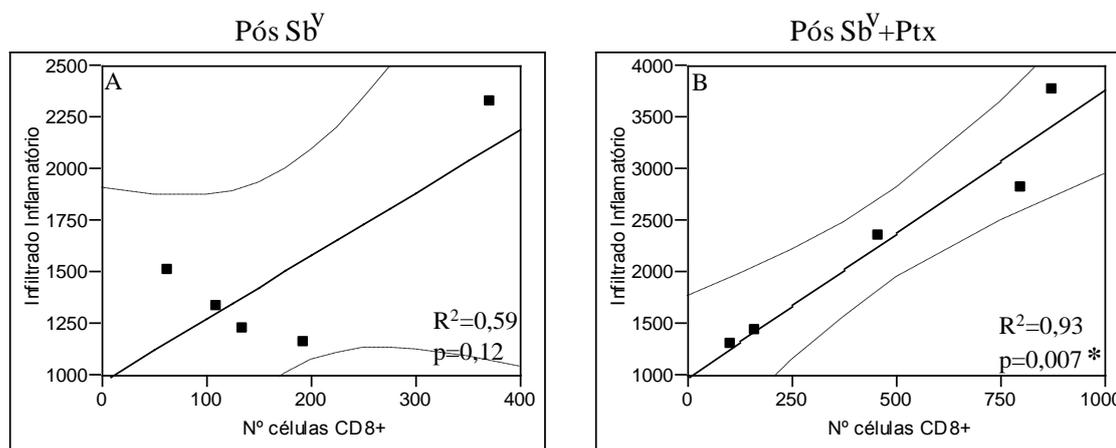


Figura 12: Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

4.3.3 Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células CD68⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Para determinarmos se o número de macrófagos CD68⁺ correlaciona-se com o infiltrado inflamatório, realizamos análises de correlação. Observou-se que não há correlação em lesões de pacientes com LM pré-tratamentos (dados não mostrados) e pós-tratamentos com Sb^V (Fig. 13A) e Sb^V associado à Ptx (Fig. 13B).

Figura 13 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células CD68⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

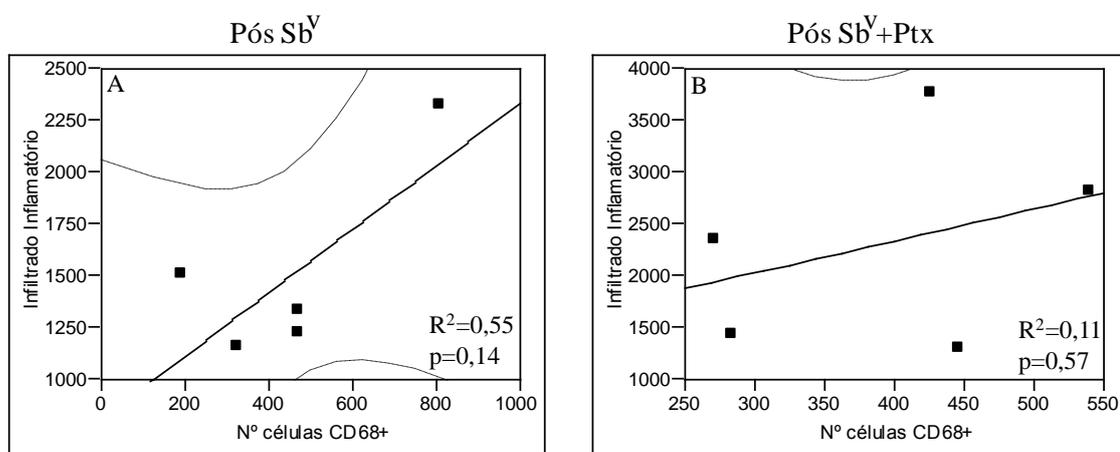


Figura 13: Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células CD68⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

4.4 Correlações entre o infiltrado inflamatório e diferentes citocinas em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

4.4.1 Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IFN- γ^+ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Para determinarmos se o número de células que expressam IFN- γ correlaciona-se com o infiltrado inflamatório, realizamos análises de correlação. Observou-se que o aumento do número de células IFN- γ^+ é acompanhado pelo aumento do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (Fig. 14A) e Sb^V associado à Ptx (Fig. 14B). O mesmo não foi observado ao analisarmos em pré-tratamentos (dados não mostrados).

Figura 14 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IFN- γ^+ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

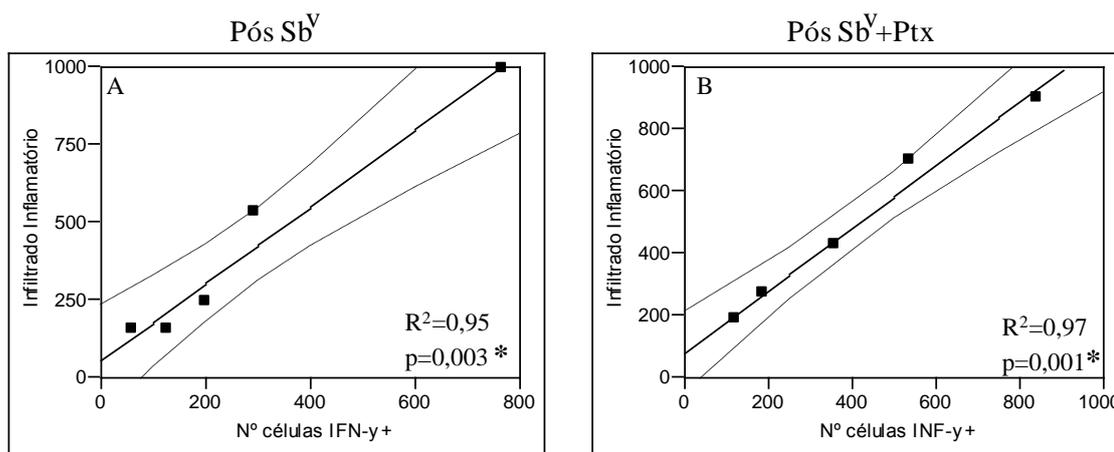


Figura 14: Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IFN- γ^+ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

4.4.2 Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células TNF- α^+ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Tendo observado que as lesões de pacientes com LM apresentaram um número de células TNF- α^+ semelhante em pré e pós-tratamentos, e, quando analisado entre os tratamentos, propusemo-nos a determinar se a expressão dessa molécula correlaciona-se com o infiltrado inflamatório. As análises de correlação mostram que o aumento do número de células TNF- α^+ é acompanhado pelo aumento do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V (Fig. 15A). O mesmo não foi observado pré-tratamento (dados não mostrados). De maneira interessante, quando analisamos as lesões de pacientes pré e pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, verificamos que não houve correlação positiva pós-tratamento (Fig. 15B).

Figura 15 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células TNF- α^+ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

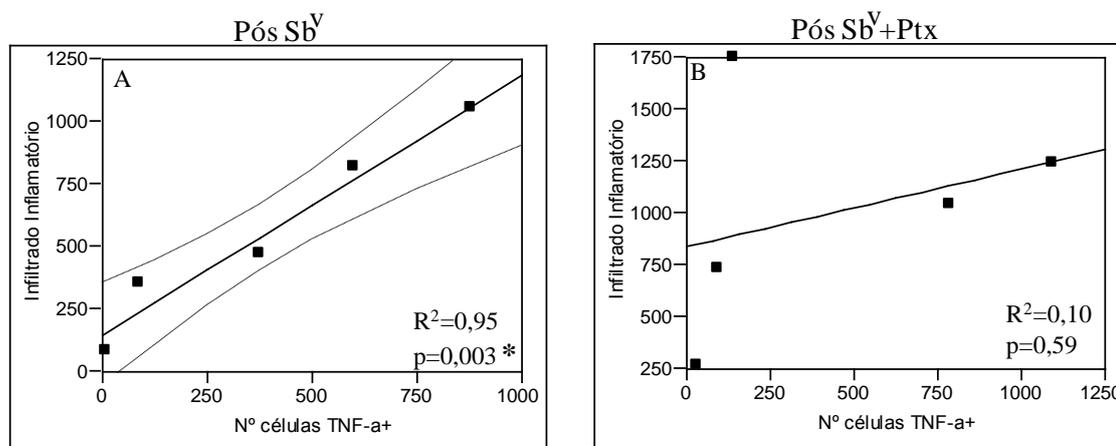


Figura 15: Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células TNF- α^+ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

4.4.3 Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Para determinarmos se o número de células que expressam IL-10 correlaciona-se com o infiltrado inflamatório, realizamos análises de correlação. Observou-se que o aumento do número de células IL-10⁺ é acompanhado pelo aumento do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V (Fig. 16A). No entanto, esta correlação não é observada em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx (Fig. 16B) e pré-tratamentos (dados não mostrados).

Figura 16 – Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

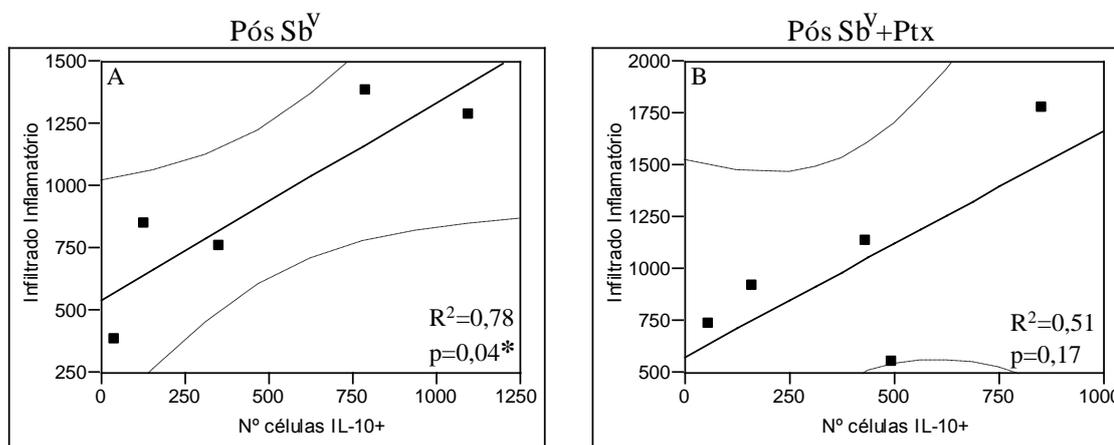


Figura 16: Análise de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

4.5. Correlação entre população celular e expressão da molécula citotóxica granzima A em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

4.5.1 Correlação entre o número de células T CD8⁺ expressando granzima A em lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos (Sb^V e Sb^V associado à Ptx)

Tendo observado que as lesões de pacientes com LM apresentaram um número de células granzima A⁺ e CD8⁺GrA⁺ semelhante em pré e pós-tratamentos, e, quando analisado entre os tratamentos, propusemo-nos a determinar se a expressão de granzima A e CD8⁺GrA⁺ correlacionam-se com o infiltrado inflamatório. Observamos que não houve correlação entre estes parâmetros (dados não mostrados). Assim, verificamos se granzima A⁺ correlaciona-se com a população de células T CD8⁺. As análises de correlação mostram que o aumento do número de células granzima A⁺ é acompanhado pelo aumento do número de células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V (Fig. 17A). O mesmo não foi observado pré-tratamento (dados não mostrados). De maneira interessante, quando analisamos as lesões de pacientes pré e pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, verificamos que não houve correlação positiva pós-tratamento (Fig. 17B).

Figura 17 – Análise de correlação entre o número de células T CD8⁺ e o número de células granzima A⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx

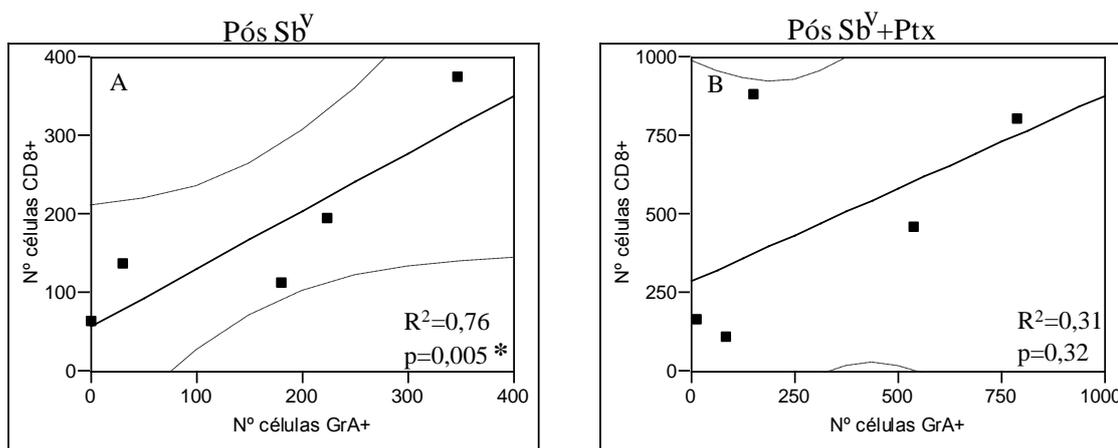


Figura 17: Análise de correlação entre o número de células T CD8⁺ e o número de células granzima A⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V (A) e Sb^V associado à Ptx (B).

5 DISCUSSÃO

A leishmaniose mucosa é uma doença destrutiva que afeta predominantemente a região da nasofaringe. É mais comum em áreas de transmissão por *Leishmania braziliensis* e geralmente ocorre meses ou anos após o tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea (JONES et al., 1987; MARSDEN, 1994; LESSA et al., 2007; CARVALHO et al., 1994 apud SOUZA et al., 2010). A patogênese da LM está associada à hiperativação de células T e uma consequente exacerbação da resposta inflamatória, incluindo a produção de altos níveis de IFN- γ e TNF- α , culminando na destruição tecidual (RIBEIRO DE JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002; CARVALHO et al., 2007).

Diante do papel de mediadores pró-inflamatórios na patogênese da destruição do tecido associado à infecção por *Leishmania*, os agentes imunomoduladores são fortes candidatos a serem adjuvantes à terapia com antimoniais. A Ptx apresenta baixa toxicidade e efeitos colaterais mínimos associados ao uso crônico (RIBEIRO DE JESUS et al., 2008). Desse modo, terapeuticamente, é muito atraente para o tratamento de doenças infecciosas, em que o dano tecidual é mediado pela resposta inflamatória induzida por TNF- α (RIBEIRO DE JESUS et al., 2008). Neste trabalho, dentre uma série de mecanismos imunológicos induzidos pela infecção por *Leishmania*, propusemos estudar a participação de diferentes populações celulares, como linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e os macrófagos CD68⁺. Além da expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e granzima A, no que diz respeito aos efeitos do uso de Ptx e Sb^V, de forma isolada ou associada no tratamento da LM.

As alterações histopatológicas observadas em lesões de pacientes com LM pré-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx, em geral, apresentaram tecido epitelial estratificado pavimentoso com presença de acantose e degeneração hidrópica na camada espinhosa. Observamos também a presença de tecido conjuntivo denso do tipo produtivo com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. O mesmo foi observado ao analisarmos lesões pós-tratamento com Sb^V, entretanto o tecido conjuntivo apresentou-se mais vascularizado e com maior frequência de células polimorfonucleares. Já nas lesões pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx observamos a presença de queratina, e, o tecido conjuntivo apresentou infiltrado inflamatório exsudativo difuso predominantemente mononuclear. Recentemente Muniz-Junqueira e Paula-Coelho (2008) avaliaram a influência de Sb^V *in vitro* sobre as funções dos fagócitos envolvidos na defesa contra *Leishmania*. Estes autores, observaram que o tratamento com Sb^V aumentou tanto o percentual de neutrófilos e monócitos, como a capacidade fagocitária destas células. Além disso, Sb^V induziu aumento da

produção de TNF- α e NO (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008). Portanto, sugere-se que os efeitos de Sb^V, sobre os fagócitos, impeçam que *Leishmania* escape da defesa imunológica. Desta forma, nossos resultados em conjunto com os dados da literatura, indicam que o tratamento com Sb^V induz maior recrutamento de neutrófilos, sugerindo a participação desta droga na quimiotaxia desses fagócitos durante a fase da inflamação. Enquanto o tratamento com Sb^V associado à Ptx induz a proliferação do tecido conjuntivo e estimulação de queratinócitos, tais fenômenos são característicos da fase proliferativa, responsável pela reepitelização (MAHDAVIAN DELAVARY, et al., 2011). Assim, interpretamos que Sb^V atua na participação da eliminação dos parasitos e Ptx pode participar da aceleração da resolução no sítio inflamatório.

Com o objetivo de entender os mecanismos que levam à cura ou ao desenvolvimento da patogênese durante a leishmaniose humana, inicialmente, nós realizamos a análise comparativa da intensidade do infiltrado inflamatório entre as lesões de pacientes com LM pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx. Nossos resultados mostram que lesões de pacientes com LM submetidos aos tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx apresentam infiltrado inflamatório de intensidade semelhante às lesões de pacientes com LM antes dos tratamentos. Com isso, sugerimos que após os diferentes tratamentos, o recrutamento de células continua ocorrendo para o sítio da lesão, porém os mecanismos imunológicos se diferem uma vez que, pacientes submetidos ao tratamento com Sb^V associado à Ptx apresentam reepitelização mais rápida em comparação aos pacientes tratados apenas com Sb^V, como observado por Machado e colaboradores (2007).

A LC geralmente está associada à resposta imune modulada, enquanto LM tende a apresentar respostas com maior magnitude. Neste contexto, a detecção de perfis imunológicos desenvolvidos por pacientes com leishmaniose, em termos de células T reativas à *Leishmania* e à produção de citocinas específicas, constitui uma importante abordagem para determinar os mecanismos envolvidos na progressão ou controle da doença. Enquanto pacientes com LC durante a fase ativa apresentaram uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺ em relação aos T CD8⁺, ao final do tratamento houve um aumento dos linfócitos T CD8⁺ (DA-CRUZ et al., 2002). O mesmo fenômeno foi observado para pacientes com LM, porém seis meses após a terapia. Desse modo, parece que o processo de cura da leishmaniose está associado com o aumento de células T CD8⁺ (DA-CRUZ et al., 2002).

A fim de determinarmos se os diferentes tratamentos interferem no perfil imunológico das lesões de pacientes com LM alterando o número de células T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos CD68⁺ presentes no infiltrado inflamatório, realizamos a análise de correlação entre a

intensidade do infiltrado inflamatório e o número dessas células após os tratamentos. Observamos que houve correlação positiva entre o infiltrado inflamatório e células T CD4⁺ pós-tratamento com Sb^V e células T CD8⁺ pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx. No entanto, não houve correlação com macrófagos CD68⁺ pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx. Portanto, o tratamento com Sb^V parece induzir maior recrutamento de células T CD4⁺, sugerindo um importante papel destas células na resolução da inflamação nesses pacientes. De forma interessante, nossos resultados corroboram com a hipótese de que células T CD8⁺ podem estar relacionadas com o processo de cura, uma vez que o tratamento com Sb^V associado à Ptx ocasiona rápida reepitelização das lesões de pacientes com LM (MACHADO et al., 2007).

Ao analisarmos as lesões de pacientes com LM submetidos aos tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx, observamos que o número de células IFN- γ ⁺ e CD4⁺IFN- γ ⁺ foi semelhante ao encontrado antes dos tratamentos. Publicações prévias sobre a produção de IFN- γ ⁺ em resposta à terapia convencional com antimônio apresentaram resultados variáveis, sem diferenças estatisticamente significativas (COUTINHO et al., 1998) ou com maior produção dessa citocina (TOLEDO et al., 2001). Embora nossos resultados não apresentem diferenças estatisticamente significativas do número de células IFN- γ ⁺ pré e pós-tratamentos, nós observamos correlação positiva entre o infiltrado inflamatório e o número de células IFN- γ ⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx. Entre as evidências para o papel da resposta imune na patogênese da LM, está a presença de infiltrado inflamatório em amostras de tecidos lesionados (BITTENCOURT; ANDRADE, 1967 apud MACHADO et al., 2007) e altos níveis de IFN- γ e TNF- α em PBMC's (DA-CRUZ et al., 1996; RIBEIRO DE JESUS et al., 1998). Pesquisadores demonstraram que a resposta do tipo Th1 observada em pacientes com LC é devido à produção de IFN- γ oriunda de fontes distintas, listadas em ordem de contribuição: linfócitos T CD4⁺, DN e T CD8⁺ (BOTTREL et al., 2001). Nós observamos que, ao eliminarmos a contribuição de linfócitos T CD4⁺ para a expressão de IFN- γ , há aumento da produção desta citocina por outras subpopulações celulares em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V, quando comparadas com as lesões dos pacientes pré-tratamento. De forma interessante, observamos que não houve diferença na intensidade da expressão de IFN- γ , sugerindo um comprometimento das células T CD4⁺ com a produção desta citocina. Em conjunto, nossos dados com os achados da literatura sugerem a importância de outras subpopulações celulares na expressão IFN- γ .

Diferentes padrões de citocinas expressas por células T estão relacionadas com a gravidade de infecções em humanos por *L. braziliensis*. Além de LM estar associada à exuberante produção de IFN- γ e TNF- α , pacientes com LM apresentam maior frequência de células que expressam granzima A em comparação aos pacientes com LC. Sugerindo assim a relevância do papel dessa molécula citotóxica na destruição tecidual (FARIA et al., 2005).

Um importante mecanismo responsável pelo controle do parasito no sítio da lesão é a citotoxicidade mediada por células T. A citotoxicidade mediada por células T CD8⁺ ocorre por meio da liberação de grânulos citotóxicos, incluindo granzima A. Nossos resultados demonstram que as lesões de pacientes com LM submetidos aos tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx apresentam números de células granzima A⁺ e CD8⁺GrA⁺ semelhantes aos encontrados antes dos tratamentos. Na leishmaniose humana, o papel de citotoxicidade nos mecanismos de defesa ou na patogênese da doença ainda permanece obscuro. Pesquisadores avaliaram a presença de células NK e linfócitos T em lesões de pacientes com LC e identificaram uma forte expressão de TIA-1, um marcador de grânulos citotóxicos que está diretamente relacionado à granzima A. Estes dados sugerem que há uma atividade citotóxica *in situ* na LC e, que, tanto as células NK como linfócitos T CD8⁺ ativados estão envolvidos nesta reação (MACHADO et al., 2002). De acordo com os nossos resultados, embora não apresentem diferenças estatisticamente significativas, observa-se que aproximadamente 70% das células T CD8⁺ estão comprometidas com a produção de granzima A tanto antes como após os diferentes tratamentos. Nossos dados em conjunto com os achados da literatura sugerem que as células T CD8⁺ podem contribuir com alta expressão de granzima A em lesões de pacientes com LM, levando ao agravamento da doença. Maasho e colaboradores (1998), pesquisando uma área endêmica de LC, observaram que indivíduos residentes nessa área, mas sem história de doença, apresentavam resposta proliferativa e produção de IFN- γ associada à ativação de células NK e T CD8⁺, em contraste com o observado em indivíduos com doença ativa, indicando que essas células estariam envolvidas na proteção desses indivíduos (MAASHO et al., 1998). De fato, é possível que as células CD8⁺GrA⁺ estejam envolvidas no mecanismo de controle da LC, no entanto, a falta de controle desta resposta dada pela alta expressão de granzima A em lesões de pacientes com LM pode levar ao agravamento da doença.

Estudos prévios por nosso grupo demonstraram que pacientes com LC em estágio tardio apresentam maior frequência de células T CD8⁺ expressando granzima A do que

pacientes em estágio inicial. Assim, a atividade citotóxica por células T CD8⁺ pode ser um importante mecanismo de destruição tecidual na leishmaniose (FARIA et al., 2009).

Para determinarmos se os diferentes tratamentos interferem na produção de granzima A por células T CD8⁺, realizamos a análise de correlação entre estes parâmetros. Observamos que as lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V apresentaram correlação positiva entre o número de células T CD8⁺ e a expressão de granzima A. De maneira interessante, quando analisamos as lesões de pacientes pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, verificamos que não houve correlação positiva. Estudos prévios, por nosso grupo, demonstraram que granzima A pode estar envolvida com uma maior destruição tecidual (FARIA et al., 2005, 2009). Desse modo, nossos dados indicam que no sítio da lesão de pacientes tratados com Sb^V encontra-se com a população de linfócitos T CD8⁺ mais comprometida com a produção de granzima A em relação às lesões de pacientes tratados com Sb^V associado à Ptx. É possível que estes resultados estejam refletindo uma influência do tratamento com Ptx na expressão de granzima A que, eventualmente, culminaria com sua redução. De fato, observando-se os resultados da figura 10 B, verifica-se que, exceto por um dos pacientes, parece haver uma tendência de redução da expressão de granzima A após tratamento com Sb^V associado à Ptx. Análises em períodos mais tardios em relação ao tratamento seriam interessantes, porém não são indicados devido à cicatrização das lesões. Se a redução da expressão de granzima A está associada a um processo de cura mais rápida, mesmo que aqui demonstrado de forma indireta, isso corrobora com a nossa hipótese anterior de que esta molécula está associada à destruição tecidual na LM.

Os macrófagos são células que funcionam como uma das primeiras linhas de defesa contra microrganismos invasores. Uma das características dos macrófagos é a sua capacidade de tornar-se ativado em resposta aos “sinais de perigo” exógenos e endógenos. Com isso, os macrófagos sofrem modificações fisiológicas que incluem o início da cascata de transdução de sinal, resultando na elaboração de quimiocinas, citocinas e mediadores tóxicos. Estas respostas podem aumentar a inflamação e muitas vezes, a resposta inflamatória é o resultado da ativação de ambos os sinais, endógenos e exógenos. Macrófagos ativados desempenham um papel fundamental, não só na iniciação da resposta inflamatória, mas também na resolução desta resposta. A elaboração de mediadores antiinflamatórios por macrófagos contribuem para a dissolução da resposta inflamatória. Assim, os macrófagos são fundamentais na iniciação, propagação e resolução da inflamação (ZHANG; MOSSER, 2008).

Como os macrófagos podem produzir vários fatores que influenciam a sua própria fisiologia e, portanto, levando-os à realização de diferentes funções imunológicas, eles foram

caracterizados de formas distintas. Assim, neste momento, parece haver pelo menos três diferentes populações de macrófagos ativados com três funções biológicas distintas. O primeiro e mais bem descrito é o macrófago ativado de forma clássica, cujo papel é atuar como uma célula efetora em resposta imune celular do tipo Th1. O segundo tipo celular é o macrófago ativado de forma alternativa, que parece estar envolvido na imunossupressão e reparo dos tecidos. O tipo celular mais recente é o macrófago ativado do tipo 2, que é antiinflamatório e preferencialmente induz resposta do tipo Th2. Juntas, essas três populações celulares podem formar a sua rede de regulação própria para prevenir uma resposta imune descontrolada na imunopatologia (MOSSER, 2003).

A resolução bem orquestrada de uma resposta inflamatória é necessária para manter a homeostase. Porém muitas doenças têm sido associadas à produção descontrolada de citocinas inflamatórias por macrófagos (MOSSER; EDWARDS, 2008). Lessa e colaboradores (2001) sugerem o envolvimento de TNF- α na exacerbação da resposta inflamatória, que resulta no agravamento das lesões dos pacientes com LM. Como mencionado anteriormente, a LM apresenta um forte perfil Th1 com altos níveis de produção de IFN- γ e TNF- α . É geralmente aceito que os macrófagos ativados classicamente se desenvolvam em resposta a dois sinais. O primeiro sinal é IFN- γ e o segundo sinal é fornecido pelo reconhecimento do antígeno. Estes estímulos geralmente induzem a produção de TNF- α por macrófagos. A combinação de TNF- α e IFN- γ resulta em ativação ideal destas células. Estes macrófagos ativados classicamente são importantes células imunes efectoras (VAN GINDERACHTER et al., 2006 apud ZHANG; MOSSER, 2008).

Pesquisadores identificaram, em pacientes com LM, altos níveis de TNF- α durante a fase ativa da doença (DA-CRUZ et al., 1996; RIBEIRO DE JESUS et al., 1998). Após o tratamento e a cura, esses níveis foram reduzidos, sugerindo que a produção excessiva dessa citocina seja um dos fatores associados à progressão da doença (DA-CRUZ et al., 1996). Além disso, a infecção por *Leishmania* altera o comportamento do macrófago por subverter suas vias de sinalização, interferindo na atividade transcricional de NF- κ B. Assim, induz quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de macrófagos, induz maior produção de TNF- α e inibe a expressão de iNOS, garantindo a sobrevivência dos parasitos (GUIZANI-TABBANE et al., 2004; GREGORY et al., 2008; CALEGARI-SILVA et al., 2009). Como parte da avaliação da resposta imune em lesões de pacientes com LM, nós analisamos a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e a colaboração de macrófagos CD68⁺ pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx. Embora nossos resultados não apresentem

diferenças estatisticamente significativas do número de células TNF- α ⁺ pré e pós-tratamentos, nós observamos que somente os pacientes submetidos ao tratamento com Sb^V associado à Ptx apresentaram redução tanto de macrófagos CD68⁺, como da expressão de TNF- α por macrófagos CD68⁺ em relação ao pré-tratamento. Além disso, ao eliminarmos a contribuição dos macrófagos CD68⁺ para a expressão de TNF- α , embora não apresente diferença estatisticamente significativa, observamos que há um pequeno aumento da expressão desta citocina por outras fontes celulares em lesões de pacientes pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx. Estes dados corroboram com a hipótese de que Ptx pode atuar diretamente no macrófago e, desta forma, induzir uma menor expressão de TNF- α . O mesmo não é observado nas células CD68⁻, uma vez que observamos um aumento da frequência destas células comprometidas com a expressão de TNF- α .

Dados da literatura demonstram que Ptx pode reduzir a expressão de TNF- α (STRIETER et al., 1988 apud WANG et al., 1997; ZHANG et al., 2007), interferindo na via de sinalização de NF- κ B (COIMBRA et al., 2005). A produção de TNF- α por células mononucleares e neutrófilos é estimulada por uma variedade de sinais extracelulares, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), que envolve eventos transcricionais. A síntese de TNF- α é dependente da ativação e translocação nuclear de NF- κ B. Coimbra e colaboradores (2005) observaram os efeitos de Ptx na fosforilação de I κ B, um inibidor citoplasmático de NF- κ B. Os resultados demonstraram que LPS induziu aumento da fosforilação de I κ B em PBMCs, enquanto o tratamento com Ptx reduziu a fosforilação de I κ B, o que sugere um declínio da produção de TNF- α . Portanto, Coimbra e colaboradores (2005) sugerem que Ptx é um importante coadjuvante nos tratamentos de doenças inflamatórias, como na sepse, que apresenta excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias, levando à injúria tecidual, falência múltipla dos órgãos e morte. Estudos prévios por Ribeiro de Jesus e colaboradores (2008) demonstram que Ptx apresenta bom efeito supressor na produção de TNF- α ⁺ em pacientes com LM, preservando a viabilidade celular. Embora a intervenção de Ptx seja terapeuticamente promissora para o tratamento de doenças infecciosas, não há evidências que Ptx elimine diretamente o parasito *Leishmania* ou atue na ativação de macrófagos. Pesquisadores observaram que a contribuição de Ptx na resposta terapêutica culmina na redução da reação inflamatória e consequente reconstituição tecidual (LESSA et al. 2001; MACHADO et al., 2007). A fim de determinarmos se os diferentes tratamentos interferem no perfil imunológico das lesões de pacientes com LM, alterando o número de células que expressam TNF- α ⁺ à medida que aumenta o infiltrado inflamatório, realizamos a análise de

correlação. Observamos que as lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V apresentaram correlação positiva entre o infiltrado inflamatório e a expressão de TNF- α . O mesmo não foi observado em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx. Desse modo, nossos dados indicam que, no sítio da lesão de pacientes tratados com Sb^V, há maior número de células comprometidas com a expressão de TNF- α em relação às lesões de pacientes tratados com Sb^V associado à Ptx. Recentemente Coimbra e colaboradores (2005) observaram que Ptx pode intervir nas vias de sinalização de NF- κ B, reduzindo a expressão de TNF- α . Enquanto Gregory e colaboradores (2008) demonstram que a infecção por *Leishmania* altera o comportamento de macrófagos por interferir na atividade transcricional de NF- κ B, induzindo quimiocinas responsáveis pelo recrutamento destas células. De acordo com esses dados, é possível que Ptx atue na atividade transcricional de NF- κ B modulando a expressão de mediadores imunológicos como, quimiocinas e citocinas envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro, de maneira antagônica aos mecanismos sofisticados desenvolvidos por *Leishmania*. Estes dados em conjunto com a ausência da correlação observada em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, fortalecem a hipótese de que Ptx pode atuar no recrutamento celular para o sítio da lesão.

Ptx pode inibir a produção tanto de TNF- α como de IFN- γ (ZHANG et al., 2007). Esse efeito é importante, uma vez que IFN- γ atua na inflamação tecidual, induzindo a produção de TNF- α por macrófagos e ativação de células T CD8⁺ citotóxicas a produzir IFN- γ e, conseqüentemente, causar destruição do tecido (RIBEIRO DE JESUS, et al., 2008).

A resposta imunológica do hospedeiro desempenha um papel fundamental no mecanismo de defesa contra a infecção por *Leishmania*. Portanto, uma resposta imunológica desequilibrada tem papel relevante no desenvolvimento da doença e, os mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da LM ainda não são claros. Pesquisadores demonstraram que pacientes com LM apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4⁺ e monócitos CD14⁺ produzindo TNF- α do que os indivíduos com LC (GAZE et al., 2006). Porém, quando analisaram a correlação entre a frequência de IL-10 e TNF- α produzidos por monócitos, apenas os pacientes com LC apresentaram correlação positiva (GAZE et al., 2006). A ausência de correlação positiva entre essas citocinas em pacientes com LM pode levar a uma resposta inflamatória descontrolada. Isto reforça a ideia de que pacientes com LM são deficientes na regulação da produção de citocinas inflamatórias *versus* antiinflamatórias por monócitos, o que pode favorecer o estabelecimento de uma resposta inflamatória exacerbada na LM (GAZE et al., 2006). As células presentes nas lesões de pacientes com LM

são altamente comprometidas com a produção de citocinas pró-inflamatórias. Estudos mostram que citocinas pró-inflamatórias induzem uma regulação negativa da expressão do receptor de IL-10 (MICHEL et al., 1997). Além disso, publicações prévias demonstraram que pacientes com LM apresentam maior produção de IFN- γ e menor expressão de receptores de IL-10 em relação aos pacientes com LC (FARIA et al., 2005).

Neste trabalho, nós não observamos um aumento do número de células IL-10⁺ e CD68⁺IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx, comparado aos pré-tratamentos. No entanto, observamos que há correlação positiva entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10⁺ em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V. Diante desses dados, os efeitos de Sb^V podem implicar na modulação da resposta imune perante uma inflamação exacerbada pela presença de IFN- γ , já que IL-10 é uma citocina imunossupressora, pois inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos (FIORENTINO et al., 1991; OSWALD et al., 1992). Há evidências de que os mecanismos para a cura ou a resistência à infecção por *Leishmania* estão associados com a ativação de macrófagos, que resulta na expressão de TNF- α e IFN- γ e na produção de radicais livres, levando à destruição dos parasitos intracelulares (ROGERS et al., 2002 apud ANTONELLI et al., 2004). Embora a resposta Th1 seja benéfica, a produção de IL-10 é essencial para o controle da resposta inflamatória exacerbada na cura da leishmaniose. Antonelli e colaboradores (2004) demonstraram que há correlação positiva entre IL-10 e TNF- α produzidos por monócitos. Estes autores sugerem que a citocina imunoregulatória IL-10 é produzida em conjunto com TNF- α por monócitos ativados. Desse modo, a ausência de correlação entre o infiltrado inflamatório e o número de células IL-10⁺ observada em lesões de pacientes com LM pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, sugere que Ptx não induz o aumento da expressão de IL-10, uma vez que os macrófagos possivelmente não foram ativados suficientemente. Além disso, ao eliminarmos a contribuição dos macrófagos CD68⁺ para a expressão de IL-10, embora não apresente diferença estatisticamente significativa, observamos que há uma tendência ao aumento da expressão desta citocina por outras fontes celulares em lesões de pacientes pós-tratamento com Sb^V associado à Ptx, sugerindo que Ptx pode interferir na ativação dos macrófagos.

A resposta imune mediada por célula é crucial no desenvolvimento da recuperação na leishmaniose. A progressão ou a modulação da patogênese estão relacionadas com uma resposta predominantemente inflamatória ou uma resposta modulatória. Todos estes dados chamam a atenção para uma nova abordagem no conhecimento dos efeitos de Sb^V e Ptx na

resolução da LM humana. Nossos achados podem contribuir para ampliar a compreensão da influência destas drogas nas funções celulares e na expressão das citocinas e moléculas citotóxicas, durante a doença e cura na modulação da resposta imune na infecção por *L. braziliensis*.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados demonstram uma complexa rede composta por diferentes tipos celulares e seus produtos durante os tratamentos da LM. A necessidade das interações celulares para a manutenção de uma resposta imune efetiva e ao mesmo tempo benéfica ao hospedeiro, pode ser demonstrada claramente através da avaliação das lesões de pacientes pré e pós-tratamentos com Sb^V e Sb^V associado à Ptx.

Nossos dados mostram que **os efeitos da combinação de Ptx com Sb^V implicam na redução da população de macrófagos CD68⁺ e na expressão de TNF- α ⁺ por macrófagos CD68⁺ em relação ao pré-tratamento**, sugerindo que Ptx pode atuar nestas células.

Logo, as informações obtidas a partir deste estudo contribuem com novas pesquisas para popor o uso de Ptx como adjuvante ao Sb^V no tratamento de LM. Assim, esta abordagem terapêutica pode resultar em uma modulação da resposta imunológica mais eficiente no sítio da lesão e, conseqüentemente, a cura acelerada dos pacientes, beneficiando a população infectada.

REFERÊNCIAS

AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; O'MAHONY, L.; PALOMARES, O.; RHYNER, C.; QUAKED, N.; SCHAFFARTZIK, A.; VAN DE VEEN, W.; ZELLER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C.A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 701-721.e1-721.e70, Mar. 2011.

ALMEIDA, R.; D'OLIVEIRA, A. JR.; Machado P.; BACELLAR, O.; KO, A.I.; DE JESUS, A.R.; MOBASHERY, N.; BRITO SANTOS, J.; CARVALHO, E.M. Randomized, Double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 180, n. 5, p. 1735-1737, Nov. 1999.

ALMEIDA, R.P.; BRITO J.; MACHADO, P.L.; DE JESUS, A.R.; SCHRIEFER, A.; GUIMARAES, L.H.; CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 1, p. 79-81, Jul. 2005.

ALMEIDA, R.P.; BRITO, J.S.; MACHADO, P.R. Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 83-91, Fev. 2005.

AMATO, V.S.; TUON, F.F.; BACHA, H.A.; NETO, V.A.; NICODEMO, A.C. Mucosal leishmaniasis - Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, p. 1-9, 2008.

AMATO, V.S.; TUON, F.F.; IMAMURA, R.; ABEGÃO DE CAMARGO, R.; DUARTE, M.I.; NETO, V.A. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 23, n. 9, p. 1026-1034, Mai. 2009.

ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, v. 136, n. 2, p. 341-348, Mai. 2004.

ANTONELLI L.R.V.; DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; CARVALHO E.M.; GOLLOB, K.J. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol Lett**, v. 101, n. 2, p. 226-230, Nov. 2005.

ASVADI, I.; HAJIPOUR, B.; ASVADI, A.; ASL, N.A.; ROSHANGAR, L.; KHODADADI, A. Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, n. 9, p. 1003-1009, Set. 2011.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v. 119, p. 238-258, Jun. 2004.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRA, M.F.; PACHECO, R.S.; VALETE-ROSALINO, C.M.; MENDONÇA, S.C. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania*

amazonensis infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n. 7, p. 735-737, Julh. 2007.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, Dez. 2002.

BACELLAR, O.; FARIA, D.; NASCIMENTO, M.; CARDOSO, T.M.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O.; SCOTT, P.; CARVALHO, E.M. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 200, n. 1, p. 75-78, Jul. 2009.

BADARO R.; LOBO, I.; MUNOS, A.; NETTO, E.M.; MODABBER, F.; CAMPOS-NETO, A.; COLER, R.N.; REED, S.G. Immunotherapy for drug-refractory mucosal leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 194, n. 8, p. 1151-1159, Out. 2006.

BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Curr Mol Med**, v. 4, n. 6, p. 601-609, Set. 2004.

BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. **J Investig Med**, v. 43, n. 3, p. 227-235, Jun. 1995.

BOAVENTURA, V.S.; SANTOS, C.S.; CARDOSO, C.R.; DE ANDRADE, J.; DOS SANTOS, W.L.; CLARÊNÇIO, J.; SILVA, J.S.; BORGES, V.M.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 10, p. 2830-2836, Out. 2010.

BOTTREL, R.L.A.; DUTRA, W.O.; MARTINS, F.A.; GONTIJO, B.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; MAYRINK, W.; LOCKSLEY, R.; GOLLOB, K.J. 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**, v. 69, n. 5, p. 3232-3239, Mai. 2001.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 97, n. 3, p. 291-296, Mai. 2003.

BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A.; BOAVENTURA, V.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **J Immunol**, v. 159, n. 9, p. 4467-4473, Nov. 1997.

BROWN, M.; NOURSADEGHI, M.; BOYLE, J.; DAVIDSON, R.N. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. **Br J Dermatol**, v. 153, n. 1, p. 203-205, Jul. 2005.

CALEGARI-SILVA, T.C.; PEREIRA, R.M.; DE-MELO, L.D.; SARAIVA, E.M.; SOARES, D.C.; BELLIO, M.; LOPES, U.G. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in

Leishmania amazonensis macrophage infection. **Immunol Lett**, v. 127, n. 1, p. 19-26, Dez. 2009.

CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; BACELLAR, O.; LESSA, M.; ALMEIDA, R.P.; MAGALHÃES, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOBO, K.J.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis 2007. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 5, p. 251-258, Mai. 2007.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A.; RONDÓN, A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 57, n. 2, p. 279-286, Ago. 1984.

CLARK, R.A.; CHONG, B.; MIRCHANDANI, N.; BRINSTER, N.K.; YAMANAKA, K., DOWGIERT, R.K.; KUPPER, T.S. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. **J Immunol**, v.176, n. 7, p. 4431-1139, Abr. 2006.

COIMBRA, R.; MELBOSTAD, H.; LOOMIS, W.; TOBAR, M.; HOYTE, D.B. Phosphodiesterase Inhibition Decreases Nuclear Factor-κB Activation and Shifts the Cytokine Response Toward Anti-inflammatory Activity in Acute Endotoxemia. **J Trauma**, v. 59, n. 3, p. 575-582, Set. 2005.

COLER, R.N.; GOTO, Y.; BOGATZKI, L.; RAMAN, V.; REED, S.G. Leish-111f, a Recombinant Polyprotein Vaccine That Protects against Visceral Leishmaniasis by Elicitation of CD4⁺ T Cells. **Infect Immun**, v. 75, n. 9, p. 4648-4654, Set. 2007.

COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; SANTIAGO, M.A.; DE-LUCA, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 139-142, Jan. 1998.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 1, p. 111-126, Jan. 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol**, v. 72, n. 2, p. 132-141, Abr. 2002.

DA SILVA, R.P.; HALL, B.F.; JOINER, K.A.; SACKS, D.L. CR1 mediates binding of L. major metacyclic promastigotes to human macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 459-463, Nov. 1988.

DA-CRUZ, A.M.; DE OLIVEIRA, M.P.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.; COUTINHO, S.G. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 225-229, Mar-Abr. 1996.

DA-CRUZ, A.M.; BITTAR, R.; MATTOS M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.; COUTINHO, S.G. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 251-256, Mar. 2002.

DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; COUTINHO, S.G. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **Br J Dermatol**, v. 153, n. 3, p. 537-543, Set. 2005.

DEAK, E.; JAYAKUMAR, A.; CHO, K.W.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; DONDJI, B.; LAMBRIS, J.D.; MCMAHON-PRATT, D. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 5, p. 1355-1368, Mai. 2010.

DE ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861-870, Out. 2003.

DE OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; PEREZ, M.A.; DA-CRUZ, A.M.; FERNANDES, O.; MOREIRA, J.; GONÇALVES-COSTA, S.C.; BRAHIN, L.R.; MENEZES, C.R.; PIRMEZ, C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **Int J Dermatol**, v. 39, n. 7, p. 506-514, Jul. 2000.

DE SÁ OLIVEIRA, T.; CAPP NETO, M.; MARTINS, B.J.; RODRIGUES, H.A.; ANTONINO, R.M.; MAGALHÃES, A.V. Action of pentoxifylline on experimental cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 477-482, Jul-Ago. 2000.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, Out. 1999.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **Isr Med Assoc J**, v. 11, n. 10, p. 623-628, Out. 2009.

ENK, A.H. DCs and cytokines cooperate for the induction of tregs. **Ernst Schering Res Found Workshop**, v. 56, p. 97-106, 2006.

ESTERRE, P.; GUERRET, S.; RAVISSE, P.; DIMIER-DAVID, L.; DEDET, J.P.; GRIMAUD, J.A. Immunohistochemical analysis of the mucosal lesion in mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 305-309, Dez. 1994.

FAN, Z.; ZANG, Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Cell Mol Immunol**, v. 2, n. 4, p. 259-264, Ago. 2005.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; BARBOSA, J.Jr.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, Dez. 2005.

FARIA, D.R.; SOUZA, P.E.; DURÃES, F.V.; CARVALHO, E.M.; GOLLOB, K.J.; MACHADO, P.R.; DUTRA, W.O. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 8, p. 432-439, Ago. 2009.

FIorentino, D.F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T.R.; Howard, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**, v. 147, n. 11, p. 3815-3822, Dez. 1991.

FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALES, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS C.M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Ann Intern Med**, v. 113, n. 12, p. 934-940, Dez. 1990.

GAZE, S.T.; DUTRA, W.O.; LESSA, M.; LESSA, H.; GUIMARÃES, L.H.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, L.P.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M.; GOLLOB, K.J. Mucosal Leishmaniasis Patients Display an Activated Inflammatory T-cell Phenotype Associated with a Nonbalanced Monocyte Population. **Scand J Immunol**, v. 63, n. 1, p. 70-78, Jan. 2006.

GOLENSER, J.; DOMB, A. New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. **Mini Rev Med Chem**, v. 6, n. 2, p. 153-162, Fev. 2006.

GOLLOB, K.J.; ANTONELLI, L.R.; DUTRA, W.O. Insights into CD4⁺ memory T cells following *Leishmania* infection. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 8, p. 347-350, Ago. 2005.

GOLLOB, K.J.; ANTONELLI, L.R.; FARIA, D.R.; KEESEN, T.S.; DUTRA, W.O. Immunoregulatory mechanisms and CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 10, p. 1338-1343, Out. 2008.

GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O.; COFFMAN, R.L. Early message expression of interleukin-4 and interferon-gamma, but not of interleukin-2 and interleukin-10, reflects later polarization of primary CD4⁺ T cell cultures. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 7, p. 1565-1570, Jul. 1996.

GONÇALVES, R.; ZHANG, X.; COHEN, H.; DEBRABANT, A.; MOSSER, D.M. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **J Exp Med**, v. 208, n. 6, p. 1253-1265, Jun 2011.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 419-433, Abr. 2010.

GRAY, P.M.; REINER, S.L.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M.; SCOTT, P. Antigen-experienced T cells limit the priming of naive T cells during infection with *Leishmania major*. **J Immunol**, v. 177, n. 2, p. 925-933, Jul 2006.

GREGORY, D.J.; GODBOUT, M.; CONTRERAS, I.; FORGET, G.; OLIVIER, M. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. **Eur J Immunol**, v.38, n. 4, p. 1071-1081, Abr. 2008.

GROGL, M.; THOMASON, T.N.; FRANKE, E.D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 1, p. 117-126, Jul. 1992.

GUIZANI-TABBANE, L.; BEN-AISSA, K.; BELGHITH, M.; SASSI, A.; DELLAGI, K. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. **Infect Immun**, v. 72, n. 5, p. 2582-2589, Mai. 2004.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 4, p. 433-444, Mar. 2004.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **J Postgrad Med**, v. 49, n. 1, p. 50-54, Jan-Mar. 2003.

HERNÁNDEZ, M.X.; BARÇANTE, T.A.; VILELA, L.; TAFURI, W.L.; AFONSO, L.C.; VIEIRA, L.Q. Vaccine-induced protection against *Leishmania amazonensis* is obtained in the absence of IL-12/23p40. **Immunol Lett**, v. 105, n. 1, p. 38-47, Mai. 2006.

HERNANDÉZ-RUIZ, J.; BECKER, I. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. **Salud Publica Mex**, v. 48, p. 430-439, 2006.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, Out. 1999.

JONES, T.C.; JOHNSON, W.D.Jr.; BARRETTO, A.C.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S.G.; NETTO, E.M.; TADA, M.S.; FRANCA, T.F. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J Infect Dis**, v. 156, n. 1, p. 73-83, Jul. 1987.

JOSHI, P.B.; KELLY, B.L.; KAMHAWI, S.; SACKS, D.L.; MCMASTER, W.R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, n. 1, p. 33-40, Mar. 2002.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-615, Jul. 2011.

KHATAMI, A.; FIROOZ, A.; GOROUHI, F.; DOWLATI, Y. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: A systematic review of the randomized controlled trials. **J Am Acad Dermatol**, v. 57, n. 2, p. 335e1-335e29, Ago. 2007.

LESSA, H.A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A.A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 2, p. 87-89, Ago. 2001.

LESSA, M.M.; LESSA, H.A.; CASTRO, T.W.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 6, p. 843-847, Nov. 2007.

LEVINGS, M.K.; BACCHETTA, R.; SCHULZ, U.; RONCAROLO, M.G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 129, n. 4, p. 263-276, Dez. 2002.

LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 361-370, Mai. 2003.

LIESCHKE, G.J.; BURGESS, A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (2). **N Engl J Med**, v. 327, n. 2, p. 99-106, Jul. 1992.

LIN, H.I.; CHU, S.J.; WANG, D.; FENG, N.H. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 37, n. 1, p. 8-15, Fev. 2004.

LLANOS-CUENTAS, A.; ECHEVARRÍA, J.; CRUZ, M.; LA ROSA, A.; CAMPOS, P.; CAMPOS, M.; FRANKE, E.; BERMAN, J.; MODABBER, F.; MARR, J. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for treatment of mucocutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 25, n. 3, p. 677-684, Set. 1997.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clin Immunol**, v. 114, n. 3, p. 256-265, Mar. 2005.

LUNA, T.; SANTOS, S.B.; NASCIMENTO, M.; PORTO, M.A.; MUNIZ, A.L.; CARVALHO, E.M.; JESUS, A.R. Effect of TNF- α production inhibitors on the production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells from HTLV-1-infected individuals. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 11, p. 1134-1140, Nov. 2011.

LUPPI, M.M.; MALTA, M.C.C.; SILVA, T.M.A.; SILVA, F.L.; MOTTA, R.O.C.; MIRANDA, I; et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 155, p. 146-151, 2008.

MAASHO, K.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E.; HAILU, A.; AKUFFO, H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. **Infect Immun**, v. 66, n. 6, p. 2698-2704, Jun. 1998.

MACHADO, P.R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L.H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A.T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R.S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E.M. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 12, p. e912, Dez. 2010.

MACHADO, P.; KANITAKIS, J.; ALMEIDA, R.; CHALON, A.; ARAÚJO, C.; CARVALHO, E.M. Evidence of *in situ* cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **Eur J Dermatol**, v. 12, n. 5, p. 449-451, Set-Out. 2002.

MACHADO, P.R.; LESSA, H.; LESSA, M.; GUIMARÃES, L.H.; BANG, H.; HO, J.L.; CARVALHO, E.M. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 6, p. 788-793, Fev. 2007.

MACHADO, P.R.; ROSA, M.E.; COSTA, D.; MIGNAC, M.; SILVA, J.S.; SCHRIEFER, A.; TEIXEIRA, M.M.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: *in situ* and systemic immune response. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 8, p. 438-444, Ago. 2011.

MAHDAVIAN DELAVARY, B.; VAN DER VEER, W.M.; VAN EGMOND, M.; NIESSEN, F.B.; BEELEN, R.H. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-762, Jul. 2011.

MAROOF, A.; BEATTIE, L.; KIRBY, A.; COLES, M.; KAYE, P.M. Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8⁺ T cells in the absence of their cognate peptide antigen. **J Immunol**, V. 183, N. 11, P. 7095-7103, Dez 2009.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, n. 2, p. 93-101, Abr-Mai. 1994.

MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; MICHALICK, M.S.; DA COSTA, C.A.; LIMA ADE, O.; MELO, M.N.; TOLEDO, V.P.; NASCIMENTO, E.; DIAS, M.; GENARO, O. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parassitologia**, v. 34, n. 1-3, p. 159-165, Dez. 1992.

MICHEL, G.; MIRMOHAMMADSADEGH, A.; OLASZ, E.; JARZEBSKA-DEUSSEN, B.; MÜSCHEN, A.; KEMÉNY, L.; ABTS, H.F.; RUZICKA, T. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. **J Immunol**, v. 159, n. 12, p. 6291-6297, Dez. 1997.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, n. 2, p. 309-322, Ago. 2010.

MOCCI, S.; COFFMAN, R.L. Induction of a Th2 population from a polarized *Leishmania*-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. **J Immunol**, v. 154, n. 8, p. 3779-3787, Abr. 1995.

MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, n. 1, p. S58-61, Nov. 2010.

MONZOTE, L. Antileishmanial patents antileishmanial current drugs and relevant patents. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 6, n. 1, p. 1 – 26, Jan. 2011.

MORELLI, P.; GIANELLI, E.; CALATTINI, S.; CORBELLINO, M. ANTINORI, S.; MERONI, L. Itraconazole can be effective in the treatment of sporotrichoid leishmaniasis. **J Travel Med**, v. 11, n. 5, p. 328-330, Set-Out. 2004.

MOSSER, D.M. An assay to quantitate the binding of *Leishmania* amastigotes to macrophages. **J Immunol Methods**, v. 130, n. 2, p. 235-242, Jul. 1990.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 2, p. 209-212, Fev. 2003.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-969, Dez. 2008.

MOTTA, A.C.; LOPES, M.A.; ITO, F.A.; CARLOS-BREGNI, R.; DE ALMEIDA, O.P.; ROSELINO, A.M. Oral leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases. **Oral Dis**, v. 13, n. 3, p. 335-340, Mai. 2007.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; DE PAULA-COELHO, V.N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 12, p. 1633-1638, Dez. 2008.

MURAILLE, E.; LEO, O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. **Scand J Immunol**, v. 47, n. 1, p. 1-9, Jan. 1998.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 135-146, Mai. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010.** Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis. Burden of disease. Magnitude of the problem.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em: 11 mai. 2011.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 18, p. 8676-8680, Set. 1992.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DAY, M.J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 197, Out. 2011.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin Exp Med**, v. 1, n. 3, p. 137-143, Set. 2001.

PARK, A.Y.; HONDOWICZ, B.D.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during Leishmania major infection. **J Immunol**, v. 165, n. 2, p. 896-902, Jul. 2000.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunol Rev**, v. 213, p. 159-179, Out. 2006.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, V. 321, N. 5891, P. 970-974, Ago. 2008.

PINKOSKI, M.J.; GREEN, D.R. Granzyme A: the road less traveled. **Nat Immunol**, v. 4, n. 2, p. 106-108, Fev. 2003.

POBER, J.S.; LAPIERRE, L.A.; STOLPEN, A.H.; BROCK, T.A.; SPRINGER, T.A.; FIERS, W.; BEVILACQUA, M.P.; MENDRICK, D.L.; GIMBRONE, M.A.J. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. **J. Immunol**, v. 138, n. 10, p. 3319-3324, Mai. 1987.

PRATA, A; SILVA-VERGARA, M.L.; COSTA, L.; ROCHA, A.; KROLEWIECKI, A.; SILVA, J.C.; DE PAULA, E.V.; PIMENTA JUNIOR, F.G.; GIRALDO, L.E. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p. 65-69, Jan-Fev. 2003.

RIBEIRO, J.M. Vector salivation and parasite transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 1-3, 1987.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 143-148, Jan. 1998.

RIBEIRO DE JESUS, A.; LUNA, T.; PACHECO DE ALMEIDA, R.; MACHADO, P.R.; CARVALHO, E.M. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in Leishmania and HTLV-I infections. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 10, p. 1344-1353, Out. 2008.

RODRIGUES, O.R.; MARQUES, C.; SOARES-CLEMENTE, M.; FERRONHA, M.H.; SANTOS-GOMES, G.M. Identification of regulatory T cells during experimental Leishmania infantum infection. **Immunobiology**, v. 214, n. 2, p. 101-111, 2009.

ROMERO, G.A.; LESSA, H.A.; ORGE, M.G.; MACÊDO, V.O.; MARSDEN, P.D. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two year follow-up. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 6, p. 511-516, Nov-Dez. 1998.

ROUSE, B.T.; SEHRAWAT, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 514-526, Jul. 2010.

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, n. 3, p. 456-459, Mai 1985.

SANTOS, J.B.; DE JESUS, A.R.; MACHADO, P.R.; MAGALHÃES, A.; SALGADO, K.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1793-1796, Nov. 2004.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 6, p. 342-349, Jun. 2006.

SCOTT, P.; HUNTER, C.A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. **Curr Opin Immunol**, v. 14, n. 4, p. 466-470, Ago. 2002.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian J Exp Biol**, v. 47, n. 6, p. 412-423, Jun. 2009.

SOUZA, A.S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J.M.; GUIMARÃES, L.H.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DE MOURA, T.R.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. **BMC Infect Dis**, Jul. 2010.

SOWER, L.E.; FROELICH, C.J.; ALLEGRETTO, N.; ROSE, P.M.; HANNA, W.D.; KLIMPEL, G.R. Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus alpha-thrombin. **J Immunol**, v. 156, n. 7, p. 2585-2590, Abr. 1996.

STOLPEN, A.H.; GOLAN, D.E.; POBER, J.S. Tumor necrosis factor and immune interferon act in concert to slow the lateral diffusion of proteins and lipids in human endothelial cell membranes. **J Cell Biol**, v. 107, n. 2, p. 781-789, Ago. 1988.

TAHIR, F.; RIAZ, H.; REHMAN, A.; MUNIR, M.B. Potential role of TNF alpha blockers in delaying the progression of hepato-renal syndrome. **Med Hypotheses**, Nov. 2011.

TOLEDO, V.P.; MAYRINK, W.; GOLLOB, K.J.; OLIVEIRA, M.A.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; PINTO, J.A.; AFONSO, L.C. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 89-98, Jan. 2001.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; BACHA, H.A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M.I.; AMATO NETO, V. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 76, n. 3, p. 866-872, Mar. 2008a.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; GRAF, M.E.; SIQUEIRA, A.M.; NICODEMO, A.C.; AMATO NETO, V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 2, p. 109-124, Fev. 2008b.

TURETZ, M.L.; MACHADO, P.R.; KO, A.I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA R.P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W.D. Jr.; CARVALHO, E.M. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **J Infect Dis**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, Dez. 2002.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, Dez. 2004.

VELEZ, I.; AGUDELO, S.; HENDRICKX, E.; PUERTA, J.; GROGL, M.; MODABBER, F.; BERMAN, J. Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized, controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 126, n. 3, p. 232-236, Fev. 1997.

VIEIRA-GONÇALVES, R.; PIRMEZ, C.; JORGE, M.E.; SOUZA, W.J.; OLIVEIRA, M.P.; RUTOWITSCH, M.S.; DA-CRUZ, A.M. Clinical features of cutaneous and disseminated

cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 9, p. 926-932, Set. 2008.

XIN, L.; WANDERLEY, J.L.; WANG, Y.; VARGAS-INCHAUSTEGUI, D.A.; SOONG, L. The magnitude of CD4(+) T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 3, p. 170-180, Mar. 2011.

WANG, W.; TAM, W.F.; HUGHES, C.C.; RATH, S.; SEM, R. c-Rel is a target of pentoxifylline-mediated inhibition of T lymphocyte activation. **Immunity**, v. 6, n. 2, p. 165-174, Fev. 1997.

WEIGLE, K; SARAIVIA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clin Dermatol**, v. 14, n. 5, p. 433-450, Set-Out. 1996.

WEINER, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunol Rev**, v. 182, p. 207-214, Ago. 2001.

ZHANG, R.; BHARADWAJ, U.; LI, M.; CHEN, C.; YAO, Q. Effects of pentoxifylline on differentiation, maturation, and function of human CD14⁺ monocyte-derived dendritic cells. **J Immunother**, v. 30, n. 1, p. 89-95, Jan. 2007.

ZHANG, X.; MOSSER, D.M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 161-178, Jan. 2008.