

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO E DE  
RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE AO ÓXIDO NÍTRICO EM  
PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
DA TERRA INDÍGENA XAKRIABÁ, MINAS GERAIS, BRASIL.**

por

Raquel Carvalho Gontijo

**Belo Horizonte  
Fevereiro de 2013**

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO E DE  
RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE AO ÓXIDO NÍTRICO EM  
PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DA TERRA INDÍGENA  
XAKRIABÁ, MINAS GERAIS, BRASIL.**

por

Raquel Carvalho Gontijo

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo  
Co-orientação: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro de 2013**

G641a  
2013

Gontijo, Raquel Carvalho.

Avaliação do perfil imunológico e de resistência/susceptibilidade ao óxido nítrico em portadores de leishmaniose cutânea na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil / Raquel Carvalho Gontijo. – Belo Horizonte, 2013.

xviii, 78 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 88 - 96

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Cutânea/imunologia 2. *Leishmania braziliensis*/parasitologia 3. Óxido Nítrico/análise I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Pascoal, Vanessa Peruhype Magalhães

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

“Avaliação do perfil imunológico e de resistência/susceptibilidade ao óxido nítrico em portadores de leishmaniose cutânea da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil”

por

Raquel Carvalho Gontijo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo

Prof. Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti

Suplentes: Dra. Fernanda Freire Campos Nunes

Dissertação defendida e aprovada em: 26/02/2013

**Dedico este trabalho à minha mãe, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, com todo seu apoio, dedicação e amor incondicional.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e principalmente por me amparar nessa jornada e me fortalecer para que eu chegasse até aqui.

Às agências de fomento que financiaram este trabalho: FAPEMIG, CNPq, FIOCRUZ e Comunidade Européia.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, pela infraestrutura e apoio logístico.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências dessa dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, pela orientação sábia, pelo exemplo de profissional e por todos os ensinamentos que me foram passados ao longo desses anos. Muito obrigada por contribuir para o meu crescimento.

À Dra. Vanessa Peruhype, por compartilhar seus conhecimentos, pela sua amizade, dedicação e paciência, e principalmente por me motivar e acreditar em mim em todos os momentos.

Aos amigos do Lalei pela convivência harmoniosa e divertida de todos os dias e pela troca de conhecimentos. Vocês foram essenciais nessa caminhada.

À Dra. Patrícia Quaresma pela amizade e companheirismo e pela colaboração durante a realização do projeto.

À Dra. Elizabeth Moreno pela colaboração no estudo epidemiológico e pela sua disposição e profissionalismo.

À Dra. Andréa Teixeira por colaborar com seus conhecimentos durante a implantação e o desenvolvimento do projeto

Ao Ms. Matheus Fernandes pelo seu apoio e por toda ajuda dispensada durante a realização deste projeto.

À Dra. Denise Lemos pela disponibilidade e pela imensa colaboração na execução deste trabalho.

À Agna Guimarães por toda disposição, dedicação e pela participação fundamental durante a execução dos experimentos.

Aos colaboradores do LBDM, por disponibilizarem seu tempo e espaço durante a execução deste trabalho.

À Ana Carolina Campi pela disponibilidade e prontidão.

À equipe de saúde de São João das Missões e da FUNASA, por todas as contribuições e por permitir a realização deste trabalho.

À população indígena Xakriabá, por nos receber com carinho, espero que possamos ter contribuído para melhoria das condições de vida e saúde na reserva.

Aos meus avós que continuam presentes em meu coração. Vocês também fizeram parte dessa conquista.

Aos meus sogros, Helton e Expedita, por ser minha segunda família.

À todos os meus amigos que tornaram essa jornada mais amena e agradável.

Ao meu pai pelo socorro nas horas difíceis e pelo apoio constante.

À minha mãe por permitir que esse sonho se tornasse real. Por tudo que fez por mim, dedicando sua vida em favor da minha, muito obrigada por me proporcionar mais essa vitória.

Ao André por todo carinho e atenção, por estar presente em todos os momentos, pela cumplicidade e compreensão nas horas difíceis, e por me fazer acreditar nos meus sonhos. Sem você nada disso seria possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO .....	XVII
ABSTRACT .....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral: .....	22
2.2 Objetivos específicos:.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 As leishmanioses .....	24
3.2 Leishmaniose Tegumentar.....	25
3.2.1 Manifestações clínicas da LT .....	27
3.2.4 Diagnóstico e tratamento da LT.....	29
3.2.2 Aspectos imunológicos da LT.....	30
3.2.3 O óxido nítrico e a LT.....	32
4 MÉTODOS.....	35
4.1 Área de estudo .....	35
4.2 Procedimentos éticos .....	37
4.3 Caracterização da população avaliada.....	37
4.3.1 Critérios de inclusão .....	40
4.3.2 Critérios de exclusão .....	40
4.4 Tratamento dos pacientes diagnosticados com LCL.....	40
4.5 Caracterização do perfil de expressão do marcador de superfície CD23 por monócitos e das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por subpopulações de linfócitos T.....	44
4.5.1 Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e marcação com Isoticianato de fluoresceína (FITC) .....	44
4.5.2 Ensaio de fagocitose de formas promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> por monócitos do sangue periférico .....	45
4.5.2.1 Avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 em monócitos do sangue periférico .....	46
4.5.2.2 Aquisição e análise in vitro da capacidade fagocítica e expressão do marcador CD23 por monócitos do sangue periférico.....	47
4.5.2.3 Avaliação do perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 intracelulares em subpopulações de linfócitos T do sangue periférico.....	49
4.5.2.4 Aquisição e análise pós-estimulação in vitro de citocinas intracelulares em subpopulações de linfócitos T do sangue periférico .....	50
4.6 Avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por monócitos .....	51
4.6.1 Obtenção de antígeno solúvel de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (ASL).....	51



4.6.2 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico, após estimulação <i>in vitro</i> com antígenos solúveis de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	52
4.6.3 Aquisição e análise do perfil de produção de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico.....	54
4.7 Quantificação dos níveis séricos de IgE total.....	55
4.7.1 Níveis séricos de IgE total.....	55
4.8 Identificação do perfil de resistência/susceptibilidade de isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> ao óxido nítrico.....	56
4.8.1 Identificação de isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> resistentes/susceptíveis ao óxido nítrico através do método do MTT .....	56
4.9 Análise Estatística .....	57
4.9.1 Caracterização do perfil de expressão do marcador de superfície CD23 por monócitos, das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos e do perfil de produção de NO por monócitos .....	57
4.9.2 Quantificação dos níveis séricos de IgE total .....	57
4.10 Análise do perfil panorâmico de biomarcadores .....	58
4.11 Identificação do perfil de resistência/susceptibilidade de isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> ao óxido nítrico.....	58
4.11.1 Determinação de IC50 .....	58
4.11.2 Cálculo do percentual de inibição da viabilidade.....	59
5 RESULTADOS .....	60
5.1 Avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 por monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM <sup>+</sup> ) e portadores de LCL, considerando o tempo de evolução da lesão na presença ou ausência de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	60
5.2 Avaliação do perfil de expressão intracelular das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM <sup>+</sup> ) e portadores de LCL, considerando o tempo de evolução da lesão na presença ou ausência de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	61
5.2.1 Avaliação do perfil de expressão intracelular das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos NI, TM <sup>+</sup> e portadores de LCL, divididos por tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	61
5.3 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos Não Infectados (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM <sup>+</sup> ) e portadores de LCL, considerando o tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	63
5.3.1 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos NI, TM <sup>+</sup> e portadores de LCL, divididos por tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	63

5.4 Análise do perfil panorâmico de biomarcadores imunológicos em indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM <sup>+</sup> ) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), considerando o tempo de evolução da lesão .....	65
5.5 Análise de correlação entre a expressão do marcador de superfície CD23, citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 e os níveis de óxido nítrico intracelular em indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM <sup>+</sup> ) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), considerando o tempo de evolução da lesão .....	67
5.6 Dosagem dos níveis séricos de IgE total em indivíduos não infectados (CT), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM <sup>+</sup> ) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL).....	67
5.7 Identificação de cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> resistentes/susceptíveis ao óxido nítrico.....	68
6 DISCUSSÃO .....	71
7 CONCLUSÕES .....	83
8 ANEXOS .....	84
9 REFERÊNCIAS .....	88

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formas promastigotas de *Leishmania sp.*(A), Formas amastigotas de *Leishmania sp.*(B) (Fonte: Manual de vigilância da LTA/MS 2007)..... 24
- Figura 2:** Distribuição geográfica das principais espécies causadoras da LT no Brasil (Fonte: SVS/MS 2007) ..... 26
- Figura 3:** Manifestações clínicas da LT: (A) Forma localizada única; (B) Forma disseminada; (C) Forma difusa; (D) Forma mucosa. Fonte: Manual de Vigilância da LTA/MS 2007. .... 28
- Figura 4:** Lesão de paciente portador de leishmaniose cutânea atípica em placa da Terra Indígena Xakriabá..... 29
- Figura 5:** Síntese de NO a partir da L-arginina. (Fonte: DAFF, 2010)..... 33
- Figura 6:** Localização geográfica do município de São João das Missões, Minas Gerais, Brasil (Fonte IBGE 2005)..... 35
- Figura 7:** Distribuição anual de casos de LT na Terra Indígena Xakriabá no período de 2001 a 2007. .... 36
- Figura 8:** Desenho esquemático ilustrando os procedimentos realizados para classificação da população avaliada pelo estudo..... 38
- Figura 9:** Esquema de tratamento utilizado nos portadores de LCL da Terra Indígena Xakriabá..... 41
- Figura 10:** Seleção e marcação de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. (A) representa o perfil das formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, selecionadas na janela “gate” em gráfico de distribuição pontual de tamanho versus granulosidade. (B) representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com FITC em gráfico de histograma..... 45
- Figura 11:** Análise do perfil de fagocitose de leishmanias-FITC por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” de monócitos em gráfico de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulosidade. (B) representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em gráfico de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). (C) representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito-FITC em gráfico de fluorescência-1 (FITC) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). .... 48
- Figura 12:** Análise da expressão de CD23 por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulosidade. (B) representa o perfil de análise da população de monócitos positivos para o marcados de superfície CD23 no quadrante

duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência-2 (CD23-PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP)..... 48

**Figura 13:** Análise do perfil de expressão de citocinas por linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos totais, selecionada na janela “gate” linfócitos totais em gráfico de tamanho versus granulocidade. (B) representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD8<sup>+</sup> positivos para citocina IFN- $\gamma$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de fluorescência-2 (IFN- $\gamma$ -PE) versus fluorescência-3 (CD8-PerCP)..... 51

Figura 14: Oxidação do DAF-2DA para uma forma fluorescente DAF-2T através da ação de esterases na presença de NO (Fonte: SCHACHNIK, 2008) ..... 53

**Figura 15:** Análise do perfil de produção de NO por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de granulocidade em função da fluorescência-3 (CD14-PerCP). (B) representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência do reagente DAF-2DA em gráfico de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). (C) representa o perfil de análise da população de monócitos produtores de NO (DAF-2T<sup>+</sup>) no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de fluorescência-1 (DAF-2T) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). ..... 55

**Figura 16:** Avaliação do perfil de expressão da molécula de ativação CD23 por monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60) estão representadas pelas letras *a*, *c*, *b*, *d*, *h*. Já as diferenças estatisticamente significativas entre as culturas na ausência (CC) ou presença (LEISH) de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* estão representadas por asterisco (\*). ..... 61

**Figura 17:** Avaliação do perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos dos grupos controle (CT), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>citocinas<sup>+</sup> em gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle (CT), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60) estão representadas pelas letras *a*, *b*, *d*. Já as diferenças estatisticamente significativas entre as culturas na ausência (CC) ou presença (LEISH) de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* estão representadas por asterisco (\*). ..... 62

**Figura 18:** Avaliação do perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>) Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como

percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>citocinas<sup>+</sup> em gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados..... 63

**Figura 19:** Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>) e clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60) estão representadas pelas letras *b*, *c*, *d*. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura controle (CC) e a cultura estimulada com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (LEISH) estão representadas por asterisco (\*). ..... 64

**Figura 20:** Comparação das assinaturas de biomarcadores após estímulo com *L. (V.) braziliensis* ou antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. (A, B, C, D e E) Frequência de alto produtores dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60), respectivamente. A análise comparativa foi realizada utilizando a curva ascendente de biomarcadores do grupo controle como referência. Situações em que as frequências de observações se localizaram em lados opostos do percentil 50 foram consideradas como diferenças relevantes. .... 66

**Figura 21:** Dosagem dos níveis séricos de IgE total nos diferentes grupos avaliados. O gráfico A corresponde à curva padrão e o gráfico B às concentrações de IgE total (ng/mL) no grupo NI, TM<sup>+</sup> e LCL. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão demonstradas pelas letras *a* e *b*. .... 68

**Figura 22:** Médias das absorvâncias referentes à avaliação do comportamento de isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes responsivos (C) e refratários (FT) ao tratamento com Glucantime® expostos a concentrações variadas de NaNO<sub>2</sub>, por MTT. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos C e FT na concentração de 512 mM..... 69

**Figura 23:** Desenho esquemático ilustrando a participação do mecanismo de ativação de monócitos e produção de NO via IFN- $\gamma$ , IL-4 e CD23 no estabelecimento e desenvolvimento da forma clínica cutânea localizada. .... 77

**Figura 24:** Desenho esquemático ilustrando a participação do mecanismo de ativação de monócitos e produção de NO via IFN- $\gamma$ , IL-4 e CD23 no controle e resistência à infecção por *L. (V.) braziliensis* ..... 79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies de <i>Leishmania</i> encontradas no homem.....	25
<b>Tabela 2:</b> População avaliada classificada segundo o tempo de evolução da lesão .....	39
<b>Tabela 3:</b> Caracterização da população do estudo imunológico.....	39
<b>Tabela 4:</b> Classificação da população avaliada no estudo de resistência/susceptibilidade ao NO.....	43
<b>Tabela 5:</b> Anticorpos utilizados para avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 por monócitos.....	47
<b>Tabela 6:</b> Anticorpos utilizados para avaliação do perfil de citocinas intracelulares....	50
<b>Tabela 7:</b> Percentual de viabilidade dos isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> de pacientes responsivos e refratários ao tratamento com Glucantime® expostos a diferentes concentrações de NaNO <sub>2</sub> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AG	Aminoguanidina
ANOVA	Análises de Variâncias
BFA	Brefeldina A
C3	Terceiro Componente do Complemento
CC	Cultura Controle
CD	Cluster of differentiation
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolofluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FL	Fluorescência
FLS	Facs Lysing Solution
FSC	Tamanho celular
FUNAI	Fundação Nacional do Índio
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LEISH	Cultura Estimulada com Formas Promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>

LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LSA	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MFF	Solução Fixadora
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Mili Molar
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofila Piridinina
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Granulosidade celular
TLR	Toll Like Receptor
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	World Health Organization



## RESUMO

Infecções causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentam manifestações clínicas diversas e a leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma clínica mais comum. Na Terra Indígena Xakriabá, localizada no norte de Minas Gerais, 212 casos autóctones de LCL foram registrados no período de 2001 a 2007. O grande número de casos e as particularidades da área reforçam o interesse de investigar aspectos da resposta imune do hospedeiro em relação à infecção. O óxido nítrico (NO) é um potente agente citotóxico presente na resposta imune anti-*Leishmania*. Na LCL, um dos mecanismos de produção de NO envolve a ligação de IgE ao receptor CD23 de macrófagos num microambiente de citocinas IFN- $\gamma$  ou IL-4. Apesar do papel crucial do NO no curso da infecção, tem sido relatada a existência de isolados de *L. (V.) braziliensis* resistentes à ação dessa molécula. Assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar por citometria de fluxo, o perfil de expressão do marcador de ativação CD23 e de produção de NO intracelular por monócitos e o perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI, n=10), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>, n=13) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL, n=17), considerando o tempo de evolução da lesão (LCL<60 dias, n=7; LCL>60 dias, n=10). Foi feita também a dosagem dos níveis séricos de IgE dos indivíduos participantes. Além disso, investigou-se a possível presença de *L. (V.) braziliensis* resistentes/susceptíveis ao NO em isolados de pacientes responsivos (C, n=5) e refratários ao tratamento (FT, n=5) com Glucantime®. Para o estudo imunológico foram realizadas culturas de leucócitos do sangue periférico na ausência (CC) ou presença de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* (LEISH) ou na presença de antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. A dosagem dos níveis séricos de IgE foi feita utilizando-se kit específico baseado na técnica ELISA sanduíche. Para identificação do perfil de resistência dos isolados foram feitos ensaios de viabilidade utilizando-se a técnica do MTT. Os resultados obtidos com o estudo imunológico mostram que o grupo LCL apresentou maior expressão de CD23 e maior produção de NO por monócitos em relação aos grupos TM<sup>+</sup> e NI, além de menor expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação ao grupo TM<sup>+</sup>. Por outro lado, o grupo TM<sup>+</sup> apresentou aumento relevante no percentual de alto produtores das citocinas avaliadas, NO e CD23 quando comparado ao grupo NI. Ao dividirmos o grupo LCL por tempo de lesão, observamos no grupo LCL<60 grande frequência de alto produtores de IL-4, NO e CD23, indicando um perfil misto de ativação/modulação da imunidade inata. Os níveis séricos de IgE total foram menores no grupo LCL quando comparado aos grupos NI e TM<sup>+</sup>, havendo redução do grupo TM<sup>+</sup> em relação ao grupo NI. Além disso, dos 10 isolados testados, 8 foram resistentes à ação do NO, sendo que, os 2 sensíveis foram provenientes de indivíduos responsivos ao tratamento com Glucantime®. Diante disso, foi possível inferir que outras fontes celulares, além dos linfócitos T, podem estar envolvidas na produção de citocinas no grupo LCL e que no grupo TM<sup>+</sup> há forte indício da participação do mecanismo de ativação de monócitos e indução de NO investigado neste estudo, favorecendo o controle da infecção, impedindo assim, o aparecimento de lesões. Além disso, a existência de isolados de *L. (V.) braziliensis* resistentes à ação do NO corrobora com achados de outros autores e pode estar diretamente relacionada com a resistência à ação do Glucantime®.

## ABSTRACT

Infections caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* presents many clinical manifestations and localized cutaneous leishmaniasis (LCL) is the most common clinical form. At the Xakriabá Indigenous Land, located in the northern Minas Gerais, 212 autochtone cases of LCL was reported during the period of 2001 to 2007. The elevated number of cases and particularities of the area reinforces the interest to investigate aspects of the host immune response in relation with infection. Nitric oxide (NO) it's a potent cytotoxic agent present in the anti-*Leishmania* immune response. In LCL, one of many mechanisms of NO production involves the IgE bind to the macrophages CD23 receptor in a cytokines IFN- $\gamma$  or IL-4 microenvironment. Despite the crucial role of NO in the infection course, has been related the existence of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates resistant to NO action. Thus, the aims of this study was evaluate, by flow cytometry, the expression profile of CD23 activation marker and NO production by monocytes, and the expression profile of cytokines IFN- $\gamma$  and IL-4 by T lymphocytes subpopulations of peripheral blood of noninfected individuals (NI, n=10), Positive Montenegro Skin Test without lesion (TM<sup>+</sup>, n=13) and patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL, n=17), considering the evolution time of the lesion (LCL<60 days, n=7; LCL>60 days, n=10). Was made too, the seric IgE levels dosage in the participants. Besides this, was investigated the possible presence of the resistant/susceptible *L. (V.) braziliensis* isolates from responsive (C, n=5) and refractory (FT, n=5) patients to treatment with Glucantime®. For the immunological study, was realized leucocytes cultures of peripheral blood in the absence (CC) or presence of live *L. (V.) braziliensis* promastigotes/*L. (V.) braziliensis* soluble antigen (LEISH). The dosage of seric IgE levels was made using a specific kit based on sandwich ELISA technique. For the resistant/susceptible profile investigation, viability assays was made using the MTT technique. The obtained results with immunological study show that the LCL group present higher CD23 expression and higher NO production by monocytes in relation with TM<sup>+</sup> e NI groups, besides lower expression of IFN- $\gamma$  e IL-4 by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes when compared to TM<sup>+</sup> group. On the other side, TM<sup>+</sup> group presents relevant increase in the percentage of higher producers of evaluated cytokines, NO and CD23 when compared with NI group. Dividing LCL group for lesion evolution time, was observed in LCL<60 increase frequency of higher producers of IL-4, NO and CD23, indicating a mixed profile of activation/modulation of the innate immunity. The total IgE seric levels was lower in the LCL group when compared to the NI and TM<sup>+</sup> groups, with a reduction of TM<sup>+</sup> in relation with NI group. Besides this, of 10 isolates tested, 8 was resistant to NO action and the 2 sensible was obtained from individuals that was responsible to the treatment with Glucantime®. In front this, was possible to infer that other cellular sources, besides T lymphocytes, could be involved in the cytokine production in LCL group and in the TM<sup>+</sup> group there is a strong possibility for the participation of monocytes activation and induction mechanism and NO induction investigated in this study, favoring the infection control, preventing the occurrence of skin lesions. Besides this, the existence of NO resistant *L. (V.) braziliensis* isolates, corroborates with other authors findings and could be directly related with Glucantime® treatment resistance.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2010). Dados epidemiológicos da FUNASA demonstram que, no Brasil, a LT representa a segunda doença tropical de maior prevalência, sendo as regiões norte e nordeste as principais áreas endêmicas. Além disso, a LT está inserida no grupo das 13 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e é classificada na categoria de “doenças emergentes e sem controle” (Lindoso & Lindoso, 2009).

A importância da LT como problema de saúde pública reside não apenas na sua elevada incidência, mas também no risco da ocorrência da forma clínica mucocutânea de difícil tratamento e que pode produzir deformidades (Leifso et al., 2007).

A ocorrência de focos de leishmaniose tegumentar em tribos indígenas no Brasil tem sido pouco estudada. Os primeiros relatos sobre sua ocorrência datam das décadas de 50-60 e referem-se a estudos em tribos do estado do Mato Grosso (Forattini & dos Santos, 1956; de Carneri et al. 1963).

O estilo de vida dos povos indígenas e as condições sociais a que estão submetidos, má nutrição, falta de higiene e saneamento, convívio estreito com animais no ambiente doméstico e peridomiciliar, favorecem a transmissão de diversas parasitoses (Pena, 2004), dentre elas a LT. Dessa forma, trata-se de uma oportunidade rara estudar aspectos diversos relacionados à LT em povos indígenas.

Alguns trabalhos anteriores têm chamado a atenção para a importância dos padrões de resposta imune na LT. Os estudos têm demonstrado que o estabelecimento e a evolução das lesões causadas por infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis* que caracterizam as diferentes formas clínicas da LT são altamente dependentes da imunidade celular (Pirmez et al., 1993; Da-Cruz et al., 1994; Coutinho et al., 1996; Baratta-Masini et al., 2007).

Vários trabalhos sugerem que a resposta imune celular do tipo 1, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , tenha um papel protetor na LT. Em modelo murino, IFN- $\gamma$  tem mostrado uma ação simultânea com outra citocina derivada de macrófagos, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), ativando a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2) para produzir o óxido nítrico (NO) resultando na morte do parasito intracelular (Liew et al., 1990; Bogdan et al., 2000).

Em 1995, Vouldoukis e colaboradores demonstraram que a ligação de IgE ao seu receptor de baixa afinidade FcεRII /CD23 em macrófagos humanos é forte e induz a produção de NO, após a ativação com IL-4 ou IFN-γ, restringindo assim o crescimento de *Leishmania major*.

Outros trabalhos demonstram que o NO tem sido fundamental para o controle de infecção por *Leishmania spp.* (Giudice et al., 2007). Apesar do papel fundamental do NO no controle da doença, a resistência do parasito a essa molécula tem sido descrita (Giudice et al., 2007). Dessa forma, é possível estabelecer correlação positiva entre a gravidade da doença e o isolamento de cepas resistentes (Fang, 1997). Porém a resistência do parasito à ação do óxido nítrico ainda não está totalmente esclarecida.

No presente trabalho, a Terra Indígena Xakriabá foi escolhida para o estudo, principalmente em função do interesse dos próprios índios, manifestado em reuniões prévias com membros de nossa equipe, representantes da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e das instituições municipais. Outro fator crucial para a escolha da localidade foram os casos autóctones de LT registrados a partir de 2001. Até o ano de 2007 foram identificados 212 casos entre os habitantes da reserva (MS/FUNASA, 2008).

Por não existirem estudos prévios na Terra Indígena Xakriabá, a única estratégia de controle atualmente adotada é o diagnóstico dos casos suspeitos e tratamento dos doentes. O estudo da resposta imune, através da avaliação do perfil de ativação celular, da produção de citocinas envolvidas na ativação de macrófagos e indução de NO e da produção de óxido nítrico intracelular, e, associados à avaliação do perfil de resistência/susceptibilidade ao NO, irão caracterizar possíveis biomarcadores indicadores de estabelecimento/manutenção e controle/cura da infecção.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Avaliar o perfil imunológico e de resistência/susceptibilidade ao óxido nítrico em portadores de leishmaniose cutânea localizada da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- 1) Caracterizar o perfil de expressão do marcador de superfície CD23 por monócitos e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4, por subpopulações de linfócitos T do sangue periférico de indivíduos não infectados (CT), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM+) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), considerando o tempo de evolução da lesão;
- 2) Avaliar o perfil de produção de óxido nítrico intracelular por monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados, Teste de Montenegro positivo sem lesão e portadores de leishmaniose cutânea localizada, considerando o tempo de evolução da lesão;
- 3) Avaliar o perfil panorâmico dos biomarcadores imunológicos NO, CD23, IFN- $\gamma$  e IL-4 em indivíduos não infectados, Teste de Montenegro positivo sem lesão e portadores de leishmaniose cutânea localizada, considerando o tempo de evolução da lesão;
- 4) Correlacionar o perfil de expressão do marcador de superfície CD23, das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4, bem como, o perfil de produção de óxido nítrico em indivíduos não infectados, Teste de Montenegro positivo sem lesão e portadores de leishmaniose cutânea localizada, considerando o tempo de evolução da lesão;
- 5) Dosar níveis séricos de IgE total em amostras de indivíduos não infectados, Teste de Montenegro positivo sem lesão e portadores de leishmaniose cutânea localizada

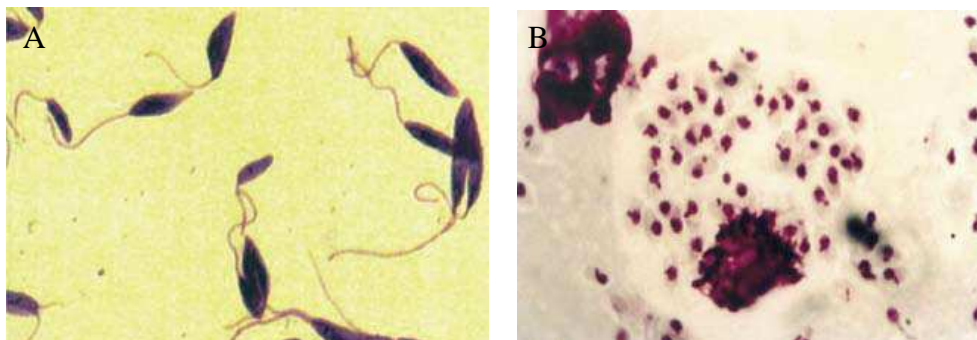
- 6) Identificar o perfil de resistência/susptibilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* ao óxido nítrico e associar com cura e falha ao tratamento com Glucantime®.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 As leishmanioses

No Novo Mundo as leishmanioses são um grupo de doenças de caráter zoonótico causadas por parasitos da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Ross 1903), transmitidos ao homem e outros mamíferos domésticos e silvestres pela picada de fêmeas de insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas principais: uma promastigota flagelada, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra amastigota sem flagelo livre, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figura 1). As amastigotas são intracelulares obrigatórias principalmente das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) (Ministério da Saúde, 2007).



**Figura 1: Formas promastigotas de *Leishmania sp.*(A), Formas amastigotas de *Leishmania sp.*(B) (Fonte: Manual de vigilância da LTA/MS 2007).**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as Leishmanioses afetam 98 países ou territórios em 5 continentes (Europa, Ásia, América, África e Oceania), com uma incidência de 2 milhões de casos ao ano (0,5 milhões de leishmaniose visceral e 1,5 milhões de leishmaniose cutânea) (WHO, 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde relata uma incidência de 28.000 casos ao ano.

No Novo mundo, as Leishmanioses apresentam duas principais formas clínicas no homem, a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT), com um amplo espectro de manifestações. Nas leishmanioses, a forma clínica é altamente dependente da espécie de *Leishmania* envolvida e do *status* imunológico do hospedeiro. Assim, existem as espécies dermatrópicas, que acometem pele e mucosas e as espécies viscerotrópicas, que possuem afinidade pelo tecido linfóide e órgãos como fígado e baço (Tabela 1).

**Tabela 1:** Espécies de *Leishmania* encontradas no homem.

<b>Subgênero</b>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
<b>Velho Mundo</b>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
<b>Novo Mundo</b>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i>	
<b>Principal tropismo</b>	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

Fonte: WHO Technical Report Series- Control of the leishmaniasis, 2010.

### 3.2 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença parasitária que acomete pele e mucosas. É primariamente uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente. No Novo Mundo, existem 15 espécies de *Leishmania* causadoras da LT divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Tabela 1).

A LT distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile. De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil tem sido encontrada em todos os estados (Figura 2), tendo sua expansão iniciada a partir da década de 80 (Ministério da Saúde, 2006).



O processo de expansão da LT tem modificado os padrões de transmissão da doença, antes associada apenas a trabalhadores rurais ou habitantes de áreas próximas à mata. Atualmente, a ocorrência da LT tem sido relatada também em áreas periurbanas e regiões desmatadas (Shimabukuro et al., 2010).

No Brasil, a LT é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle. Até o momento, sete espécies do gênero *Leishmania* foram identificadas no Brasil como causadoras de LT. Seis dessas espécies pertencem ao subgênero *Viannia* e apenas uma pertence ao subgênero *Leishmania*. As espécies mais importantes são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ambas amplamente distribuídas no território nacional e a *L. (V.) guyanensis*, que ocorre na região Norte. As outras espécies, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenberg* contribuem para um número menor de notificações e são restritas aos estados do Norte e Nordeste como mostrado na Figura 2.



**Figura 2:** Distribuição geográfica das principais espécies causadoras da LT no Brasil (Fonte: SVS/MS 2007)

### 3.2.1 Manifestações clínicas da LT

Muito tem sido estudado a respeito das relações parasito-hospedeiro na LT, principalmente a resposta imune dos hospedeiros. Este foco na imunidade remete ao importante papel desempenhado pelo sistema imune no curso da infecção. Contudo, vale ressaltar que diversos fatores, em conjunto, irão determinar o complexo espectro de manifestações clínicas da doença.

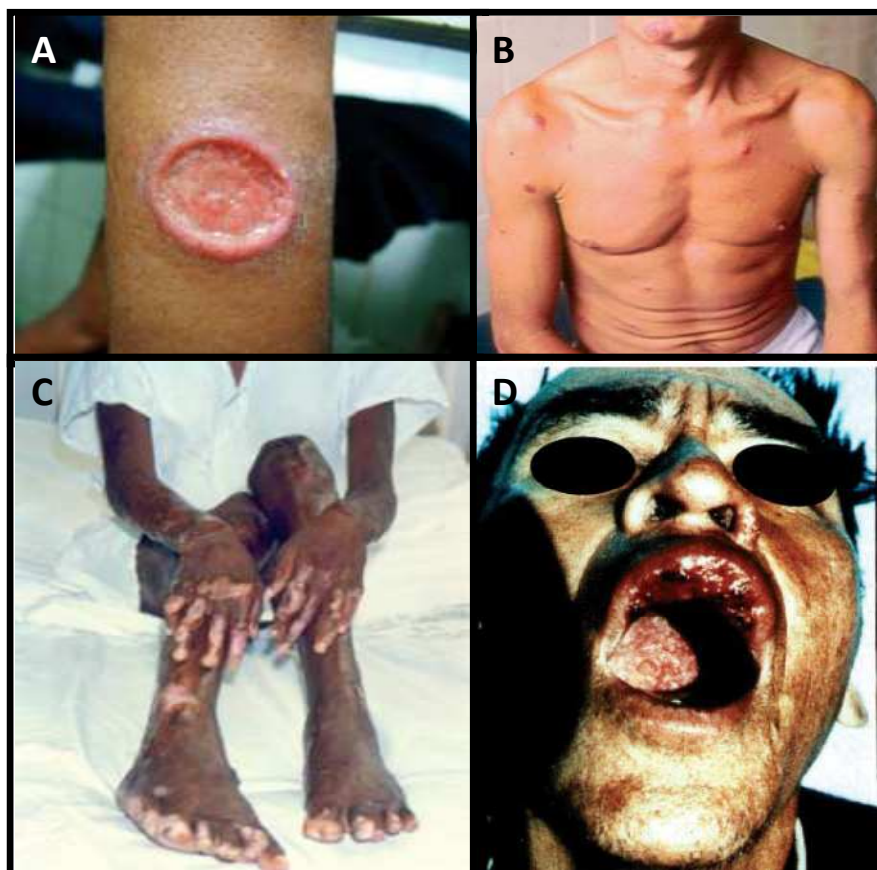
Além da espécie de *Leishmania* envolvida, há alguns fatores intrínsecos ao hospedeiro, como *status* imunológico, presença de co-morbidades, má nutrição e predisposição genética, que podem torná-lo mais susceptível à ação do parasito e agravar os sintomas da doença.

A LT possui um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo a forma cutânea (LC), a mais comum. Na forma cutânea localizada a lesão é, geralmente, caracterizada pelas bordas altas e o fundo granuloso, sendo na maioria das vezes indolor (Figura 3A). Há também a forma cutânea disseminada (Figura 3B) caracterizada por lesões ulceradas pequenas, muitas vezes acneiformes, distribuídas por todo o corpo do indivíduo. Na LC, a imunidade celular é preservada, o que pode ser verificado através da positividade ao teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Esta resposta celular específica, bem modulada, mas com predominância de citocinas do tipo 1, reflete a tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento.

Na LC, sabe-se que a incapacidade de montar uma resposta imune celular eficaz está associada à evolução clínica da doença e, muitas vezes a falhas terapêuticas. Em pacientes imunocomprometidos a LC pode apresentar quadros clínicos atípicos, com tendência à disseminação e má resposta aos esquemas quimioterápicos usuais (Ministério da saúde, 2006). A leishmaniose difusa (Figura 3C) é considerada forma rara da LC e se encontra distribuída em alguns países das Américas, África e Ásia. Essa forma clínica é caracterizada por maciço comprometimento dérmico e natureza crônica. Isso ocorre devido à ausência de resposta imune celular efetiva contra o parasito, que se multiplica sem controle, aumentando o número de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal. Na forma difusa, o teste cutâneo de Montenegro é caracteristicamente negativo, devido à ausência de resposta inflamatória do hospedeiro.

Ao contrário da leishmaniose difusa, a leishmaniose mucosa (LM) é caracterizada pela exacerbação da resposta celular anti-*Leishmania*, com escassez de

parasitos e IDRMs positivos. O principal agente etiológico da LM é a *L. braziliensis*, e o comprometimento das mucosas é, na maioria das vezes, secundário às lesões de pele (Figura 3D). Essa forma acomete a mucosa e cartilagem nasofaríngeas e na maioria das áreas endêmicas, 1 a 10% de infecções cutâneas localizadas resultam na forma mucosa num período de um a cinco anos após a cura das lesões cutâneas (Marsden, 1986).



**Figura 3:** Manifestações clínicas da LT: (A) Forma localizada única; (B) Forma disseminada; (C) Forma difusa; (D) Forma mucosa. Fonte: Manual de Vigilância da LTA/MS 2007.

Além destas manifestações clínicas da LT, alguns trabalhos (Lescure *et al.*, 2002; Guimarães *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 2009) relatam casos de leishmaniose cutânea que não se enquadram em nenhuma das formas clínicas bem caracterizadas da doença, cuja denominação adotada tem sido LT atípica (Figura 4). A presença de lesões incomuns e não da úlcera típica caracteriza esta forma na qual os pacientes podem ser portadores de lesões verrucosas, crostosas, vegetativas e até mesmo lesões lupóides (Freire *et al.*, 2011).



**Figura 4:** Lesão de paciente portador de leishmaniose cutânea atípica em placa da Terra Indígena Xakriabá.

Além disso, é importante ressaltar que cerca de 10% dos indivíduos residentes em área endêmica apresentam teste de hipersensibilidade tardia a antígeno de *Leishmania* positivo e não desenvolvem a doença, caracterizando uma forma subclínica de LTA (Follador et al, 2002). Corroborando com este estudo, em inquérito epidemiológico realizado na Terra Indígena Xakriabá em 2008 por nosso grupo, foi verificada uma prevalência de 19,2% de indivíduos que apresentaram Teste de Montenegro positivo sem a presença de lesões ou cicatrizes condizentes com LT (Freire, 2011).

#### 3.2.4 Diagnóstico e tratamento da LT

O diagnóstico laboratorial da LT pode ser parasitológico, imunológico ou molecular. O diagnóstico parasitológico baseia-se na pesquisa de parasitos em esfregaços de lesões, culturas (*in vitro*) de fragmentos de biópsias de lesão ou aspirados de lesão cutânea. O diagnóstico imunológico pode ser feito de forma indireta, através da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasito (intradermorreação de Montenegro - IDRM), que deve ser lida em 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de endurecimento maior ou igual a 5mm. O diagnóstico imunológico por sorologia é mais utilizado no diagnóstico da forma visceral, uma vez que a LT produz baixa titulação de anticorpos. Já o diagnóstico molecular, consiste na detecção do DNA do parasito através de métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O tratamento da LT reside na utilização de quimioterápicos. Há mais de 50 anos o antimonial pentavalente tem sido administrado, e é a droga de primeira escolha, preconizada pelo Ministério da Saúde (Ouellette, 2004).

A OMS e o Ministério da Saúde recomendam para o tratamento da LT 20mg de antimônio pentavalente/Kg durante 20 dias, no caso da forma cutânea e difusa, ou durante 30 dias para a forma mucosa, podendo-se repetir o tratamento caso haja falha terapêutica (Ministério da Saúde, 2007).

O mecanismo de ação do antimônio ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que a droga atue nas formas amastigotas do parasito, inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (Berman, 1988). A principal limitação desse medicamento, que produz efeitos adversos potencialmente graves e fatais, é a toxicidade (Sampaio et al. 1997, Oliveira et al. 2005), impedindo sua administração em pacientes com doenças pré-existentes, além de exigir monitoramento cuidadoso de diversas funções orgânicas (Herwaldt & Berman, 1992).

Há drogas alternativas como stibugluconato de pentamidina e anfotericina B, utilizadas nas formas rebeldes ao tratamento convencional e quando há contra-indicação ao uso do antimonial. Há também a anfotericina B em sua forma lipossomal, que reduz bastante os efeitos colaterais, porém seu custo é mais elevado (Ouellette, 2004).

Outra droga tem sido bastante estudada, por ser a única de via oral, a miltefosina. Tal medicamento se mostrou eficaz no tratamento da LV e alguns casos de LT já foram tratados (Sundar, 2002).

Vale enfatizar que mesmo com o tratamento adequado a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso é freqüente, sendo de 2% nos casos tratados e ao redor de 10% nos casos não tratados (Basano & Camargo, 2004).

### 3.2.2 Aspectos imunológicos da LT

A resposta imune celular tem papel importante na patogênese da leishmaniose tegumentar. Segundo alguns autores, formas promastigotas de *Leishmania* spp. ligam-se a receptores específicos em macrófagos e são internalizadas por um processo denominado fagocitose (Mosser & Rosenthal, 1993). A interação inicial dessas promastigotas com macrófagos é fundamental para o estabelecimento da infecção no hospedeiro (Rosenthal et al. 1996).

Após a internalização dos parasitos via fagocitose, há transformação da forma promastigota em amastigota, capaz de sobreviver no interior dos macrófagos. Dessa forma, o macrófago parasitado servirá como célula apresentadora de antígeno e produzirá citocinas para atrair e ativar outras células do sistema imune.

Na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, uma intensa resposta do tipo 1, com alta produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é observada. Esse tipo de resposta inflamatória, apesar de estar associada ao controle da infecção, se não modulada, pode levar ao dano tecidual. Essa ativação de células do tipo 1 é observada em todas as formas clínicas da infecção causada por *Leishmania braziliensis* como também por outras espécies como a *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Convit et al, 1993).

Por outro lado, a diminuição da resposta inflamatória, com aumento das citocinas reguladoras, como a IL-10, por exemplo, favorece a disseminação e a multiplicação do parasito.

Alguns indivíduos são capazes de montar a resposta à infecção sem desenvolver a doença aparente. Follador e colaboradores (2002) comparou a resposta imune de indivíduos sem história de doença e com Teste de Montenegro positivo, com a resposta de indivíduos com leishmaniose cutânea. Os resultados obtidos demonstraram que os indivíduos Teste de Montenegro positivo têm resposta tipo 1 em níveis bem menores que aqueles com LC, sugerindo que a resposta tipo 1 modulada pode ser suficiente para proteger contra o estabelecimento e desenvolvimento da infecção evitando o comprometimento tecidual.

Uma vez que a *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório do sistema mononuclear fagocitário, o principal mecanismo de defesa do organismo é a produção de IFN- $\gamma$ , necessária para ativação de macrófagos e síntese de derivados do oxigênio, como óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Carvalho et al., 2005).

Alguns estudos em camundongos C57BL-6, demonstraram que a resposta do tipo 1, associada à produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , está relacionada à resistência do indivíduo ao patógeno e conseqüentemente à cura espontânea da lesão, enquanto a resposta tipo 2, caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5 em camundongos BALB/c, está associada à susceptibilidade à infecção (Scott et al., 1988). Entretanto, o paradigma Th1 *versus* Th2 não explica a patogênese das formas clínicas da leishmaniose tegumentar causadas pela *L. (V.) braziliensis*. Em contraste com a observação que na leishmaniose cutânea difusa existe uma ativação de células do tipo 2 ( Bomfim et al, 1996), pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* produzem grandes quantidades de

citocinas pró-inflamatórias, que a despeito de controlar a multiplicação do parasito, não impedem o desenvolvimento da lesão (Bacellar et al, 2011).

Apesar do importante papel da IL-4 na resposta Th2, inibindo a produção de importantes citocinas ativadoras de macrófagos, tem sido avaliado o papel dessa citocina no contexto da resposta inflamatória. O aumento de iNOS e consequente produção de óxido nítrico foi relatada por alguns autores após o tratamento de macrófagos com IL-4 (Vouldoukis et al., 1995; Paul-Eugène et al., 1995). Além disso, em estudo realizado por Mossalayi e colaboradores (1999), foi demonstrado que um pico na produção de IL-4 nos momentos iniciais da infecção, coincide com os níveis de IFN- $\gamma$ , e se mantém até a cura, sugerindo que há sinergia entre essas duas citocinas e participação de ambas na ativação de macrófagos.

De acordo com alguns autores, a LC tende à cura espontânea (Goto & Lindoso 2010). Dessa forma, tem sido evidenciado que culturas de células de pacientes apresentando cura espontânea das lesões produzem mais IFN- $\gamma$  que pacientes com lesão ativa (Carvalho et al. 1995). Já na cura clínica, após tratamento específico, observa-se maior produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células NK que ativam macrófagos. Estas células produzem TNF- $\alpha$  que em sinergia com o IFN- $\gamma$  induzem ativação de iNOS e produção de NO, agente citotóxico responsável pela destruição das formas amastigotas e eliminação do parasito. Assim, acredita-se que o grau de resistência dos parasitos aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos esteja diretamente relacionado com a severidade das lesões na LT (Giudice et al. 2007).

### 3.2.3 O óxido nítrico e a LT

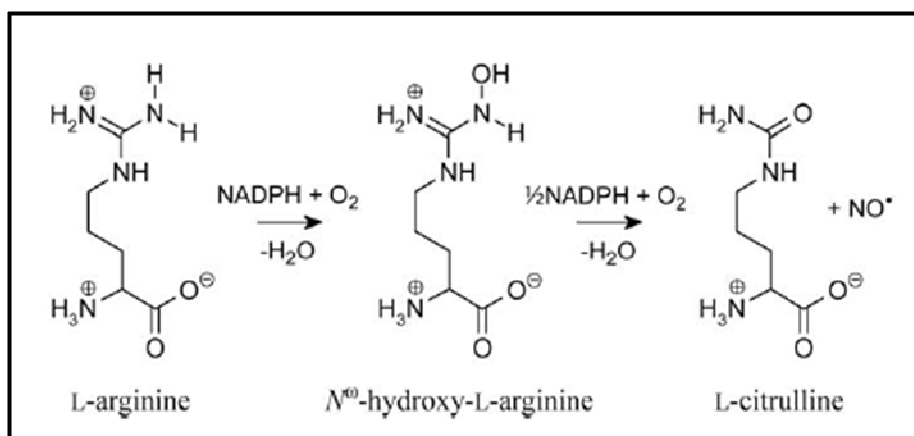
O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso com um curto espaço de meia-vida biológica (Santoro et al., 2001). O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas e está presente em quase todos os sistemas do organismo (Morris & Billiar, 1994).

O NO tornou-se uma das substâncias mais amplamente estudadas por causa de seu papel paradoxal importante em várias funções biológicas (Lampiao et al., 2006). Em 1992, foi selecionado pela revista "Science" como a "Molécula do ano" (Strianese et al., 2010). Isto refletiu a importância crucial desta molécula em uma variedade de processos biológicos.

O óxido nítrico é gerado a partir da oxidação do nitrogênio guanido-terminal da L-arginina por uma enzima dependente de NADPH, a óxido nítrico sintase

(NOS)(Voudoulkis et al.; 1995). O NO é sintetizado por duas isoformas distintas dessa enzima a NOS induzível (iNOS, NOS II), e a NOS expressa constitutivamente (NOS-3, ecNOS, NOS III) (Nathan & Xie, 1994).

Todas as NO sintases catalizam a reação mostrada abaixo (Figura 5):



**Figura 5:** Síntese de NO a partir da L-arginina. (Fonte: DAFF, 2010).

A enzima NOS catalisa a síntese do NO em dois ciclos distintos, produzindo a N-hidroxi-L-arginina como produto intermediário e a L-citrulina como subproduto. Os dois ciclos consomem uma molécula de oxigênio (O<sub>2</sub>) e necessitam da participação de elétrons exógenos que são fornecidos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A atividade da NOS também é influenciada pelos co-fatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Gorren & Mayer, 2007).

A síntese do NO pode ser inibida por análogos da L-arginina como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-AA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Esses inibidores atuam de forma competitiva sobre as três isoformas da NOS. Além desses inibidores, a aminoguanidina (AG) também é capaz de inibir a NOS apresentando relativa seletividade para a iNOS (Uchida et al., 2007).

O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Sua importância biológica é representada pela capacidade de atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo moléculas-alvo envolvidas em diferentes



processos como regulação do tônus vascular, controle imunológico e neurotransmissão (Rathel et al., 2003; Barreto et al., 2005).

O óxido nítrico tem sido descrito como um potente agente citotóxico e citostático na resposta imune celular, capaz de limitar o crescimento de vários microorganismos intracelulares (Arturo et al., 2010).

Na LT, o NO é produzido após ativação dos macrófagos por citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Goldman et al., 2001). Além disso, Vouldoukis e colaboradores (1995), demonstraram que a ligação de IgE ao seu receptor de baixa afinidade Fc $\epsilon$ RII /CD23 em macrófagos humanos é forte e induz a produção de NO, restringindo o crescimento de *Leishmania major*. Tem sido descrito que níveis séricos de IgE e a expressão do CD23 estão aumentados na leishmaniose cutânea, e monócitos/macrófagos humanos expressam Fc $\epsilon$ RII/CD23 após a ativação com IFN- $\gamma$  ou IL-4 (Sousa-Atta et al., 2002; Delespesse et al., 1991).

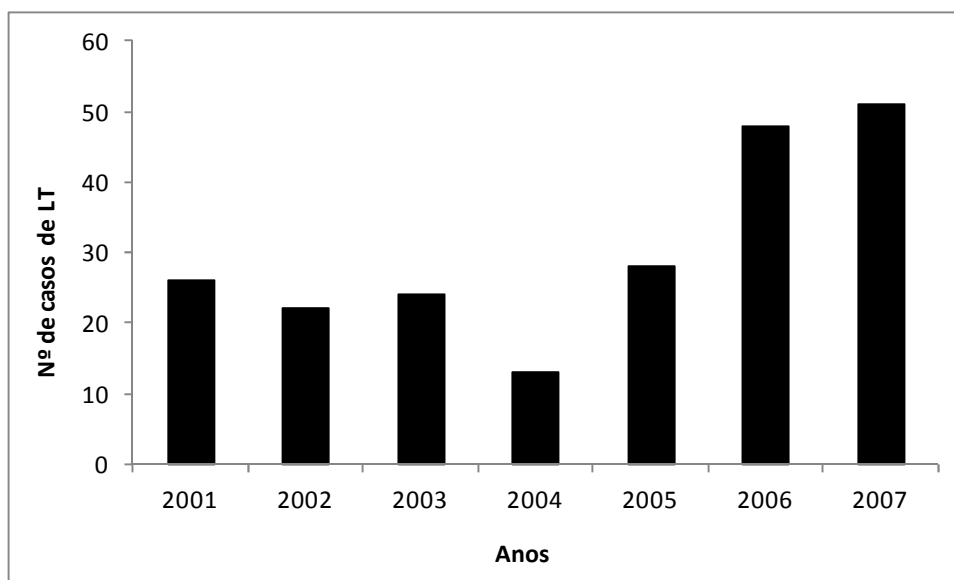
Apesar do poder de citotoxicidade do NO a *Leishmania* utiliza de alguns mecanismos de escape. Uma vez fagocitado pelo macrófago, o parasito consegue induzir a produção de TGF- $\beta$ , citocina capaz de bloquear a produção de NO (Green et al., 1994). Além disso, a *Leishmania* utiliza a arginina como nutriente. Essa arginina é convertida em ornitina pela arginase, enzima presente no parasito que compete com a iNOS pelo substrato, diminuindo assim a síntese de NO (Iniesta et al., 2002; Roberts et al. 2004).



A principal atividade econômica dos Xakriabá é a agricultura, cultivada de modo tradicional e voltada para a subsistência da família. Há na reserva grande precariedade de suas condições de vida diante de uma produção alimentar insuficiente, da crescente escassez de recursos hídricos, esgotamento das terras cultiváveis e carência de serviços básicos (Clementino & Monte-Mór, 2006).

As condições de saneamento dos Xakriabá são bastante precárias, fazendo aumentar a incidência de verminoses e outras parasitoses. Além disso, a atuação da FUNASA na reserva é recente. As equipes de saúde foram contratadas a partir de 2000 e as intervenções sanitárias foram iniciadas efetivamente em 2001 (Pena & Heller, 2008).

A reserva indígena foi selecionada para o estudo devido ao grande número de casos de LT registrados nos últimos anos. No período compreendido entre 2001 e 2007 foram registrados 212 casos. O gráfico abaixo mostra a distribuição destes casos por ano (Figura 7):



**Figura 7:** Distribuição anual de casos de LT na Terra Indígena Xakriabá no período de 2001 a 2007.

Um amplo estudo da epidemiologia da LT na reserva Xakriabá está sendo realizado por diferentes equipes do Centro de Pesquisas René Rachou, com o auxílio de diversos colaboradores externos. O estudo aborda aspectos da fauna flebotômica e de pequenos mamíferos, bem como a identificação de espécies de *Leishmania* que infectam humanos, flebotomíneos e animais silvestres, sinantrópicos e domésticos. Além disso, o estudo em humanos aborda aspectos epidemiológicos, clínicos, imunológicos e

moleculares, na busca do diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos casos identificados e determinação de biomarcadores de monitoração das diferentes formas clínicas da doença. O objetivo final deste grande projeto é produzir conhecimentos necessários a adequação dos serviços de saúde na perspectiva de promover a implementação de medidas preventivas e de controle adequadas a realidade local.

#### **4.2 Procedimentos éticos**

O trabalho foi realizado em concordância com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa em seres humanos, mediante aprovação do Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou (CEPSH/CPqRR - Protocolo nº 021/2007), da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – Processo nº 25000.037372/2008-88) e autorização para ingresso em terra indígena fornecida pela FUNAI (Processo nº 2098/08).

Todos os casos detectados na reserva no decorrer do estudo receberam assistência adequada, com diagnóstico e tratamento, independente de terem sido alocados para os propósitos da presente investigação.

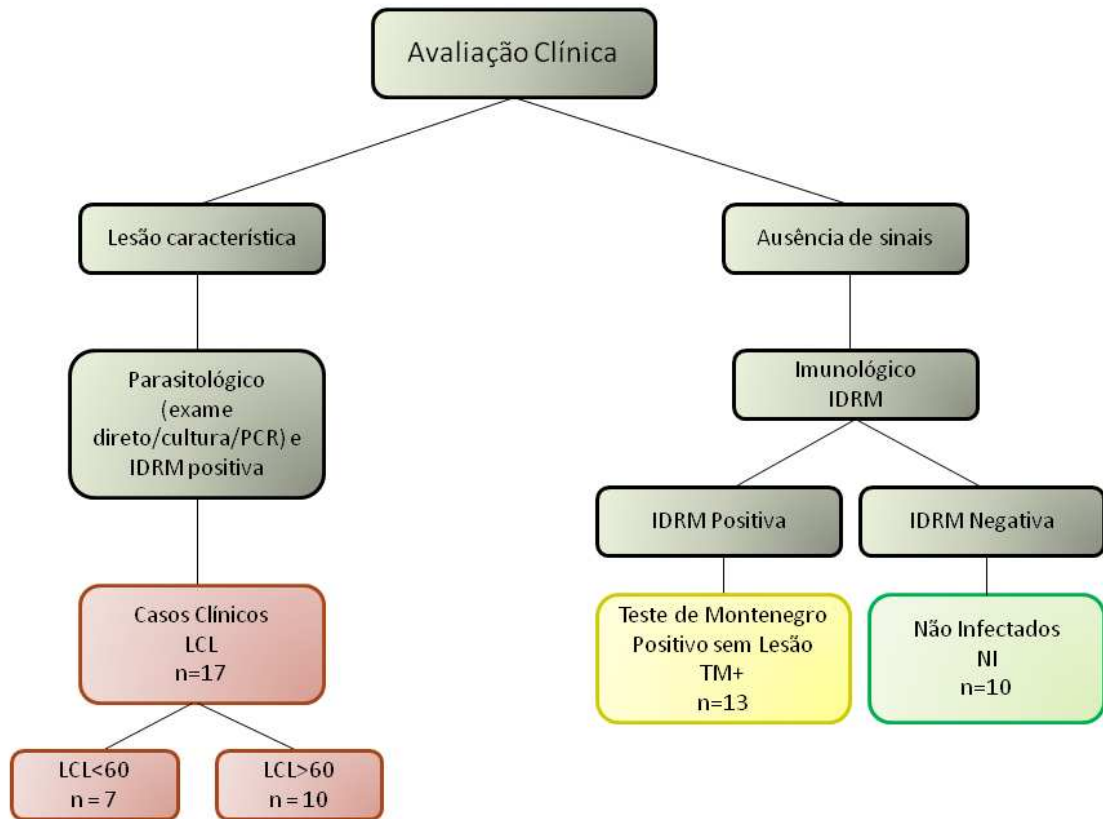
A participação no estudo foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes ou seus responsáveis legais, no caso de menores de 18 anos.

#### **4.3 Caracterização da população avaliada**

Inicialmente foi realizada IDRMM em todos participantes do estudo no local de domicílio. Posteriormente, os indivíduos foram convocados a comparecer ao Posto de Saúde mais próximo, 48 horas após a realização do inóculo, para leitura do teste e realização de exame clínico e, se necessário, aspirado/biópsia da lesão pelo médico responsável.

Dessa forma, foram considerados *i) casos clínicos (leishmaniose cutânea localizada - LCL)*, pacientes com lesão característica associada à confirmação parasitológica (exame direto ou cultivo de aspirado/biópsia da lesão ou reação em cadeia da polimerase - PCR positivos) e imunológica (IDRM); *ii) indivíduos Teste de Montenegro positivo (TM<sup>+</sup>)*, aqueles com IDRMM positiva na ausência de lesões ou cicatrizes; *iii) indivíduos não infectados (NI)*, aqueles que não apresentaram sinais sugestivos de LT e IDRMM negativa (Figura 8). Em seguida, os resultados foram

encaminhados para o setor médico responsável, onde os casos detectados receberam tratamento e acompanhamento adequados.



**Figura 8:** Desenho esquemático ilustrando os procedimentos realizados para classificação da população avaliada pelo estudo.

Os pacientes do grupo clínico (LCL) foram separados em dois subgrupos de acordo com o tempo de evolução da lesão para análises comparativas posteriores. Foram consideradas *lesões recentes* aquelas com tempo de evolução de *até 60 dias* (LCL < 60 n = 7), e *tardias*, aquelas com tempo *superior a 60 dias* (LCL > 60 n=10). A separação foi feita de acordo com critérios estabelecidos por nosso grupo, tendo em vista que não há um padrão para classificar o tempo de evolução da lesão (Tabela 2).

**Tabela 2:** População avaliada classificada segundo o tempo de evolução da lesão

<b>ID</b>	<b>TL</b>	<b>Classificação</b>
333	2	LCL < 60
430	1	LCL < 60
416	2	LCL < 60
412	2	LCL < 60
301	1	LCL < 60
377	1	LCL < 60
387	1	LCL < 60
316	24	LCL > 60
314	3	LCL > 60
344	4	LCL > 60
339	12	LCL > 60
320	3	LCL > 60
66	12	LCL > 60
338	12	LCL > 60
373	12	LCL > 60
376	4	LCL > 60
380	3	LCL > 60

ID: identificação de paciente; TL: tempo de evolução da lesão (meses); LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

A tabela abaixo mostra as características gerais dos grupos avaliados no estudo imunológico (Tabela 3).

**Tabela 3:** Caracterização da população do estudo imunológico

<b>GRUPO</b>	<b>FE</b>	<b>SEXO</b>	<b>NL</b>	<b>TL</b>
Clínico – LCL (n=17)	7-45	10M – 7F	1-9	1-24
Teste de Montenegro positivo sem lesão – TM <sup>+</sup> (n=13)	13-63	6M-7F	-	-
Controle – CT (n=10)	14-52	3M-7F	-	-

FE: Faixa etária (anos); NL: Número de lesões; TL: Tempo de lesão (meses).

#### *4.3.1 Critérios de inclusão*

Após realização dos exames diagnósticos, os indivíduos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- Idade compreendida entre 7 a 65 anos;
- Conclusão dos exames propostos;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo voluntário ou responsável.

#### *4.3.2 Critérios de exclusão*

Foram excluídos desse estudo todos os indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão definidos acima ou que apresentaram:

- Qualquer doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos;
- Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores;
- Uso de medicação tópica sobre a lesão cutânea e uso prévio de leishmanicidas;
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol) (Skinner et al. 1984);
- Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- Anemia significativa, definida como hemoglobina menor que 10 g/dL (Stoltzfus & Dreyfuss 1998).
- Desnutrição.

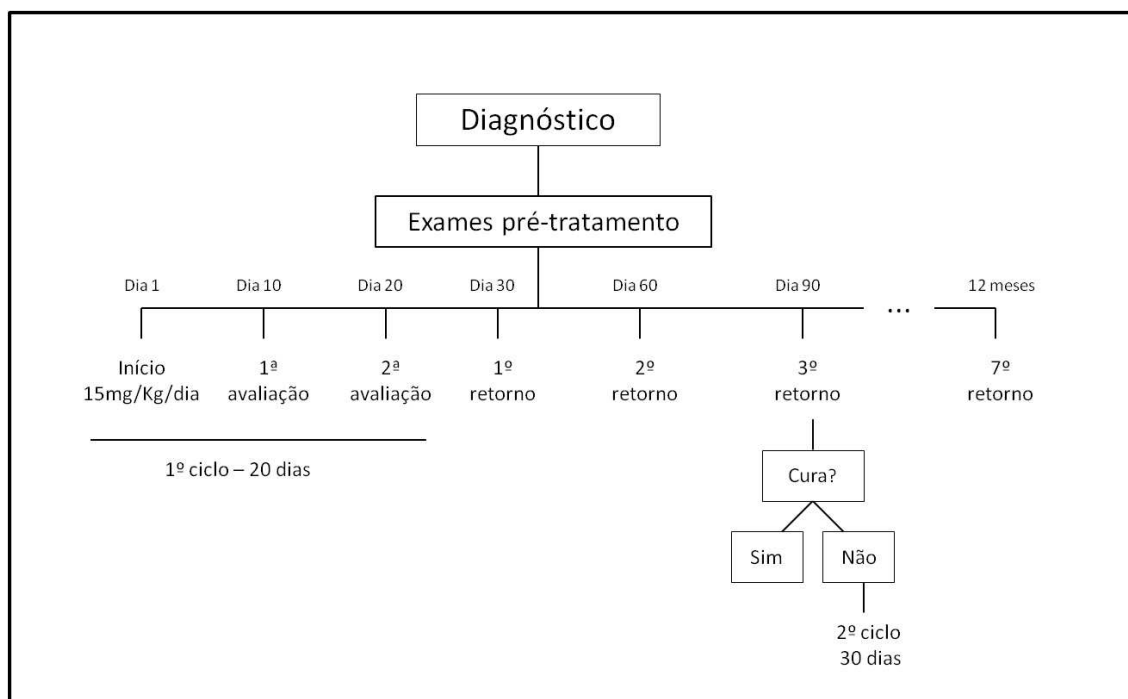
### **4.4 Tratamento dos pacientes diagnosticados com LCL**

Todos os pacientes diagnosticados com LCL através dos exames clínico, parasitológico ou molecular e imunológico, foram encaminhados para o tratamento. A droga escolhida foi o antimoniato de N-Metil Glucamina (Glucantime®), preconizada pelo Ministério da Saúde, utilizando-se 15mg/Kg/dia, durante 20 dias.

Antes de dar início ao tratamento, os pacientes passaram por uma série de exames, com o objetivo de avaliar a função renal, hepática e cardíaca, uma vez que,

certas alterações nesses exames e doenças pré-existentes impedem a administração do antimonial, além de exigir monitoramento cuidadoso de diversas funções orgânicas.

Para isso, ao iniciar o tratamento, o paciente passou por duas avaliações no dia 10 e dia 20 após o início da administração do medicamento. Em seguida, o paciente passou a ser monitorado nos retornos a cada 30 dias. Caso no terceiro retorno (90 dias) o paciente não apresentasse cura, o tratamento era repetido com 30 doses de Glucantime®. Os pacientes foram monitorados até o 7º retorno (12 meses após a 20ª dose) como mostrado no esquema abaixo (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema de tratamento utilizado nos portadores de LCL da Terra Indígena Xakriabá.

O tratamento dos pacientes foi realizado pela médica infectologista de nossa equipe, Dra. Janaína de Moura Freire e auxiliado pela equipe do posto de saúde da reserva.

As amostras de isolados de *L. (V.) braziliensis* dos indivíduos portadores de LCL da Terra indígena Xakriabá selecionados para o estudo de resistência/susceptibilidade ao NO foram classificadas de acordo com a evolução durante o tratamento com Glucantime® (Tabela 4). Foram selecionados isolados de 5 pacientes que foram responsivos ao tratamento, ou seja, obtiveram cura durante ou após a administração do primeiro ciclo de tratamento com antimonial, estes foram classificados como “Curados” (C). Os outros 5 isolados foram obtidos de pacientes



que necessitaram de mais de um ciclo de tratamento ou apresentaram recidiva após a epitelização da lesão. Estes foram classificados como “Falha Terapêutica” (FT) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Classificação da população avaliada no estudo de resistência/susceptibilidade ao NO.

ID	I	SEXO	FC	NL	AL	TC	DA	RECIDIVA	CURA 1° C	CLASSIFICAÇÃO
387	22	F	LCL	1	Úlcera/Pápula	81	15mg/kg/dia	Não	Sim	C
316	20	M	LCL	2	Úlcera/Pápula	16	15mg/kg/dia	Não	Sim	C
426	18	M	LCL	1	Úlcera	90	15mg/kg/dia	Não	Sim	C
327	09	M	LCL	1	Placa	28	15mg/kg/dia	Não	Sim	C
396	16	F	LCL	3	Úlcera/Placa	240	15mg/kg/dia	Não	Sim	C
390	42	M	LCL	2	Verrucosa/Pápula	170	15mg/kg/dia	Não	Não	FT
340	12	F	LCL	1	Úlcera	125	15mg/kg/dia	Sim	Sim	FT
370	32	M	LCL	1	Úlcera	126	15mg/kg/dia	Sim	Sim	FT
339	09	F	LCL	9	Pápula	60	15mg/kg/dia	Sim	Sim	FT
416	19	M	LCL	2	Úlcera/Pápula	60	15mg/kg/dia	Sim	Sim	FT

ID: identificação do paciente; I: idade (anos); FC: forma clínica; NL: Número de lesões; AL: aspecto da lesão; TC: tempo de cura (dias); DA: dose de antimonial; CURA 1° C: cura no 1° ciclo de tratamento.

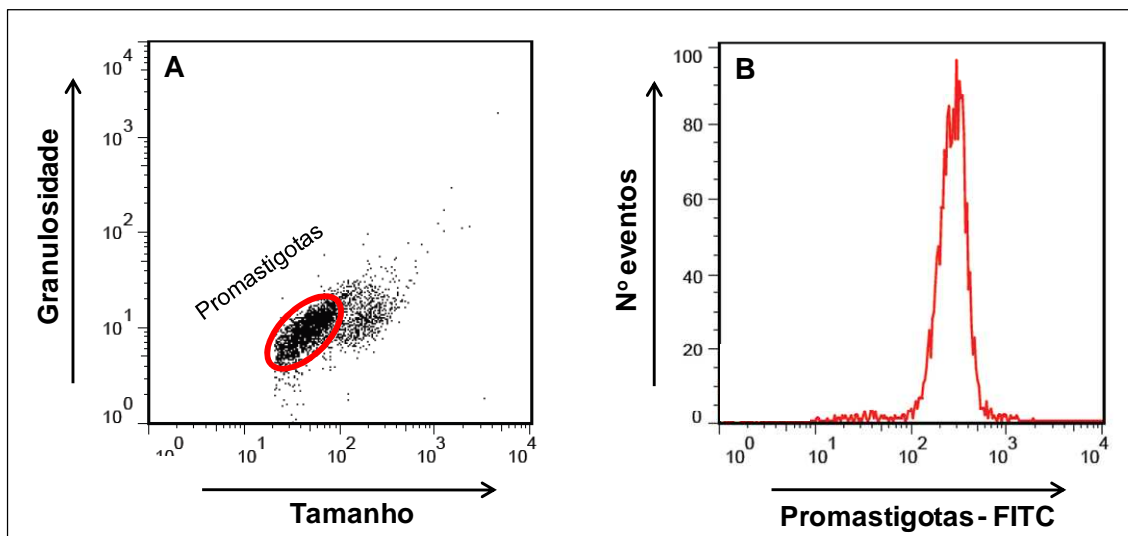
#### **4.5 Caracterização do perfil de expressão do marcador de superfície CD23 por monócitos e das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por subpopulações de linfócitos T**

##### *4.5.1 Obtenção de formas promastigotas de Leishmania (V.) braziliensis e marcação com Isoticianato de fluoresceína (FITC)*

As formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1986/MSS), foram obtidas a partir de cultivos em erlenmeyers contendo 30 mL de meio líquido complexo LIT suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), por 7 dias (final da fase estacionária de crescimento), em estufa B.O.D a temperatura de 26°C (Sadigursky & Brodskyn 1986, Schuster & Sullivan 2002). Os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) e a suspensão foi submetida a centrifugação diferencial a 10 x g (Centrífuga Beckman, Modelo J-6B, E.U.A.), durante 10 minutos a temperatura ambiente, para remoção de contaminantes como eritrócitos e grumos de parasitos não viáveis no sedimento. Os parasitos foram recuperados após um período de repouso de 30 minutos em estufa B.O.D a temperatura de 26°C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de polipropileno de 50 mL e o sedimento foi desprezado. Em seguida, adicionou-se 20 mL de tampão fosfato salino PBS 0,015M, pH 7,4 - PBS 1X (SIGMA, E.U.A.) suplementado com 10% de SFB, homogeneizando com movimentos circulares e centrifugou-se a suspensão celular a 357 x g, durante 07 minutos a 18°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido cuidadosamente. Adicionou-se 1 mL de PBS 1X suplementado com 10% de SFB, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para  $1 \times 10^8$  promastigotas/mL.

Para marcação das leishmanias, inicialmente volumes equivalentes de parasitos vivos e da preparação do fluorocromo FITC 200  $\mu\text{g/mL}$  (Fluorescein Isothiocyanate, Isômero I -  $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$ ), foram incubados por 30 minutos em estufa B.O.D a temperatura de 26°C. Após incubação dos parasitos com FITC, esses foram lavados por centrifugação a 357 x g, durante 10 minutos a 18°C com PBS 0,015M, pH 7,4 - PBS 1X. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi ressuspendida com PBS 1X para um volume adequado de parasitos, ou seja, levando-se em consideração o número de amostras a serem testadas e a relação parasito/célula previamente estabelecida (0,5/1). Separou-se uma alíquota para avaliação no citômetro de fluxo a fim de se avaliar as características morfométricas dos parasitos e a intensidade de

fluorescência apresentada por eles após a marcação com FITC. A maioria dos parasitos apresentou intensidade média de fluorescência (IMF) entre  $10^2$  e  $10^3$  (Figura 10).



**Figura 10:** Seleção e marcação de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. (A) representa o perfil das formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, selecionadas na janela “gate” em gráfico de distribuição pontual de tamanho versus granulidade. (B) representa a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com FITC em gráfico de histograma.

#### 4.5.2 Ensaio de fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* por monócitos do sangue periférico

Na execução dos ensaios de avaliação imunológica foram usadas duas abordagens metodológicas, sendo uma destinada à avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e outra ao perfil de citocinas intracelulares. Inicialmente, foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo anticoagulante EDTA (4 mL) e heparina sódica (30 mL) (Vacutainer, Becton Dickinson - BD, E.U.A.). Em seguida, hemograma foi realizado e a partir do valor da global de leucócitos de cada indivíduo avaliado, calculou-se os ajustes necessários para obtenção de uma preparação celular com  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL.

Posteriormente, o sangue periférico coletado em heparina sódica foi transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) e centrifugado a  $664 \times g$  a temperatura de  $18^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Após centrifugação, o plasma obtido foi armazenado em um tubo de polipropileno de 15 mL, inativado por 30 minutos a temperatura de  $56^\circ\text{C}$ , aliquoteado e criopreservado. Adicionou-se PBS 1X suplementado com 10% de SFB (mesmo volume de plasma retirado), homogeneizou-se a suspensão celular que foi lavada, em seguida, por

centrifugação a 664 x g a temperatura de 18°C por 10 minutos (esse procedimento foi repetido por mais uma vez). Em seguida, foi realizado o ajuste da concentração celular para  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL.

Após ajuste, leucócitos do sangue periférico foram incubados com parasitos vivos, em tubos de cultura de polipropileno de 14 mL, por uma hora sob agitação constante em homogeneizador hematológico (Hemoquímica Mod. H1, Brasil), (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.), em estufa a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Além disso, foram realizadas também culturas nas mesmas condições descritas acima, entretanto, na ausência de parasitos, que foram utilizadas como culturas controle. Após esse período de incubação, foi adicionado 20 µL de Brefeldina A - BFA (Sigma, E.U.A.) em todos os tubos (concentração final de 10 µg/mL), que foram mantidos por mais quatro horas em estufa nas condições mencionadas anteriormente. Posteriormente, foi adicionado 220 µL de EDTA (Sigma, E.U.A.) 20 mM, concentração final de 2 mM, e as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. É importante mencionar que foram realizadas culturas em duplicata para avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e citocinas intracelulares.

#### *4.5.2.1 Avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 em monócitos do sangue periférico*

Amostras de 200 µL das culturas obtidas nos ensaios de fagocitose foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.), contendo 2 µL de anticorpos monoclonais para identificação da população de monócitos (anti-CD14-PerCP), e da molécula CD23 (anti-CD23-PE), receptor de baixa afinidade para IgE (Tabela 5). Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 3 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - FLS, Becton Dickson - BD, E.U.A), diluída dez vezes em água destilada, e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados, as suspensões celulares ressuspensas em vortéx e adicionou-se 3 mL de PBS 0,015M, pH 7,4, contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de ázida sódica (Sigma, E.U.A.) - PBS-W. As células foram lavadas por centrifugação a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos. Posteriormente, os tubos foram vertidos, as suspensões celulares ressuspensas em vortéx e adicionou-se 150

μL de solução fixadora - MFF (10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) em cada tubo. Após período de 15 minutos a 4°C, um total de 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickson - BD, E.U.A.).

**Tabela 5: Anticorpos utilizados para avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 por monócitos.**

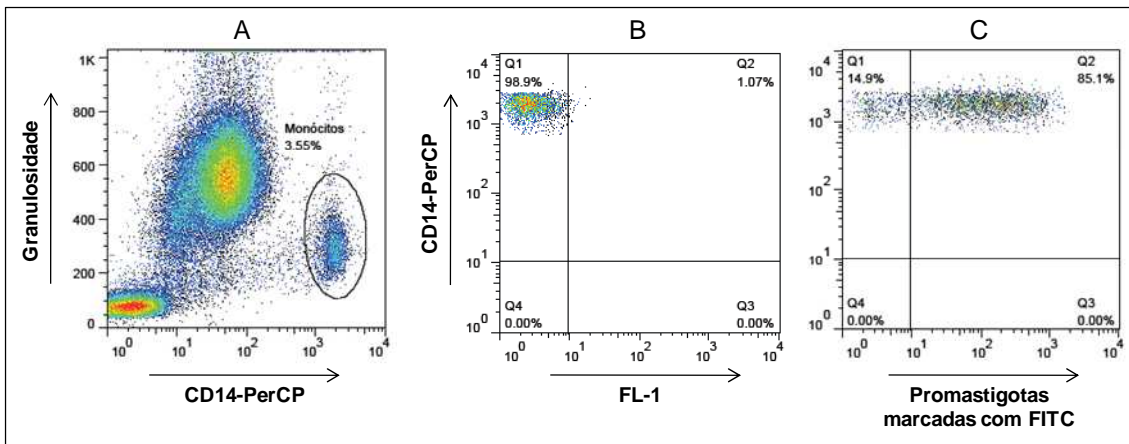
Marcador	Fluorocromo	Clone	Concentração	Funções
Anti-CD23	PE	M-L233	0,5 μg	Molécula de ativação celular, receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRII)
Anti-CD14	PerCP	9	0,5 μg	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) expresso em células mielomonocíticas

**Fonte:** CD Reference Chart. 8th HLDA International Workshop 2004, Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença 2007.

#### 4.5.2.2 Aquisição e análise in vitro da capacidade fagocítica e expressão do marcador CD23 por monócitos do sangue periférico

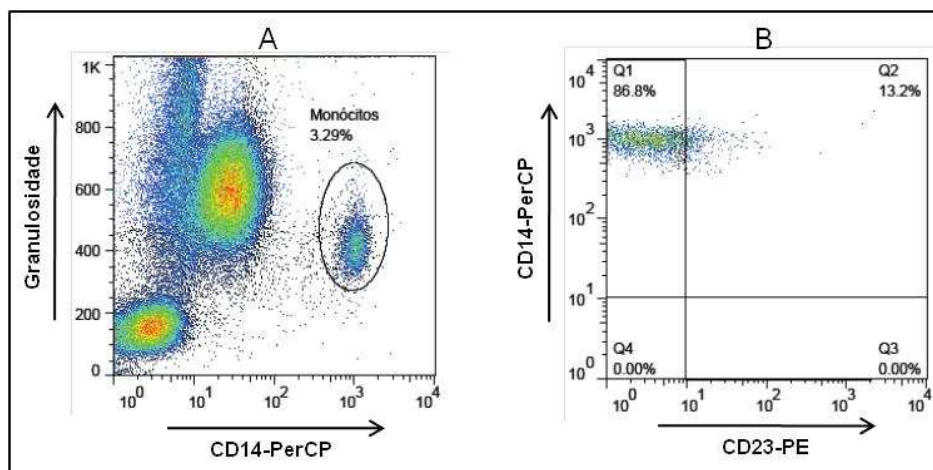
Para identificação da população celular de interesse e determinação da capacidade fagocítica e do valor percentual dos marcadores fenotípicos avaliados utilizou-se o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1.).

A Figura 11 representa, de forma esquemática, o método utilizado para análise desses resultados. A estratégia consistiu na identificação da população de monócitos, que foi selecionada por uma janela - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC) (Figura 11A). Após a seleção da população de interesse, foram construídos gráficos de fluorescência 1 (FL1, leishmanias-FITC) versus fluorescência 3 (FL3, CD14-PerCP) para análise do perfil de fagocitose de *L. (V.) braziliensis* por monócitos. As figuras 11B e 11C representam o perfil de monócitos na ausência e presença de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, respectivamente. Como demonstrado na figura 11C, observa-se, no quadrante duplo positivo (Q2), o percentual de monócitos que fagocitaram leishmanias-FITC.



**Figura 11:** Análise do perfil de fagocitose de leishmanias-FITC por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” de monócitos em gráfico de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulidade. (B) representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em gráfico de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). (C) representa o perfil de análise da população de monócitos na presença de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* marcadas com FITC, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito-FITC em gráfico de fluorescência-1 (FITC) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).

A primeira estratégia (Figura 12A) consistiu na identificação da população de monócitos. A figura 12B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção do marcador de superfície CD23 na população de monócitos, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD23-PE) versus fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP).



**Figura 12:** Análise da expressão de CD23 por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP) em função da granulidade. (B) representa o perfil de análise da população de monócitos positivos para o marcados de superfície CD23 no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de densidade de fluorescência-2 (CD23-PE) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).

#### 4.5.2.3 Avaliação do perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 intracelulares em subpopulações de linfócitos T do sangue periférico

Amostras de 500  $\mu$ L das culturas obtidas nos ensaios de fagocitose foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) contendo anticorpos monoclonais para identificação das subpopulações de linfócitos T (anti-CD4-PerCP e anti-CD8-PerCP) (Quadro 2). Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 3 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - FLS, Becton Dickson - BD, E.U.A.), diluída dez vezes em água destilada, e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos e posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular ressuspensa em vortéx. Em seguida, adicionou-se 500  $\mu$ L de PBS 0,015M, pH 7,4, contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de ázida sódica (Sigma, E.U.A.) - PBS-W, homogeneizou-se em vortéx e posteriormente foram acrescentados 3 mL de PBS-W contendo 0,5% de saponina (Sigma, E.U.A.) - PBS-P. Os tubos foram fechados, homogeneizados por inversão e incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as suspensões celulares foram lavadas por centrifugação a 357 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as suspensões celulares ressuspensas em vortéx e adicionou-se 3 mL de PBS-W. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação a 357 x g, a temperatura de 18°C por 7 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram desprezados e as células ressuspensas em 250  $\mu$ L de PBS-W. Alíquotas de 30  $\mu$ L das amostras foram transferidas para placas de fundo em U de 96 poços (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.), contendo 20  $\mu$ L de anticorpos monoclonais anti-citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  (Tabela 6), previamente diluídos em PBS-P, e, em seguida, incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, adicionou-se 100  $\mu$ L de PBS-P/poço, homogeneizou-se levemente e a placa foi submetida a centrifugação a 357 x g, a temperatura de 18°C por 7 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas em vortéx e, em seguida, adicionou-se 200  $\mu$ L de PBS-W, homogeneizou-se levemente e as suspensões celulares foram lavadas por centrifugação a 357 x g, a temperatura de 18°C por 7 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas em vortéx, adicionou-se 200  $\mu$ L de solução fixadora -



MFF/poço e, em seguida, as suspensões celulares foram transferidas para microtubos de poliestireno de 500 µL (Falcon, Becton Dickinson - BD, E.U.A.). Após um período de 15 minutos a 4°C, um total de 20.000 linfócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos, fenotípicos e funcionais foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACScan - BD.

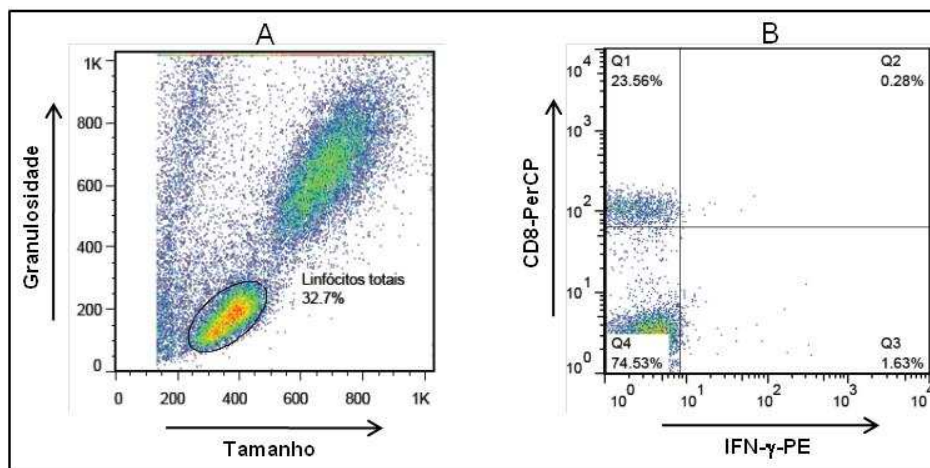
**Tabela 6:** Anticorpos utilizados para avaliação do perfil de citocinas intracelulares

Marcador	Fluorocromo	Clone	Concentração	Funções
Anti-IL-4	PE	8D4-8	0,25 µg	Ativação de células B, mudança para IgE, induz diferenciação em células Th2. Produzida por células T e mastócitos.
Anti- IFN-γ	PE	4S.B3	0,25 µg	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas MHC e dos componentes do processamento de antígenos, mudança de classe de Ig, supressão de Th2. Produzido por células T e NK.
Anti-CD4	PerCP	SK3	0,5 µg	Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.
Anti-CD8	PerCP	SK1	0,5 µg	Co-receptor para MHC de classe I, expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos.

*Fonte:* Sigal 2004 (Part I and II), *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença* 2007.

#### 4.5.2.4 Aquisição e análise pós-estimulação *in vitro* de citocinas intracelulares em subpopulações de linfócitos T do sangue periférico

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de citocinas intracelulares foram realizadas pelo software FlowJo. A primeira estratégia consistiu na identificação da população de linfócitos totais por meio de gráficos de tamanho celular (Forward Scatter - FSC) versus granulosidade celular (Figura 13A). A figura 13B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina IFN-γ na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 13:** Análise do perfil de expressão de citocinas por linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos totais, selecionada na janela “gate” linfócitos totais em gráfico de tamanho versus granulidade. (B) representa o perfil de análise da população de linfócitos TCD8<sup>+</sup> positivos para citocina IFN- $\gamma$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de fluorescência-2 (IFN- $\gamma$ -PE) versus fluorescência-3 (CD8-PerCP).

## 4.6 Avaliação do perfil de produção de óxido nítrico intracelular por monócitos

### 4.6.1 Obtenção de antígeno solúvel de *Leishmania (V.) braziliensis* (ASL)

As formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1986/MSS) foram cultivadas conforme descrito no item 4.5.1 da metodologia. Posteriormente, verificou-se a viabilidade dos parasitos pela técnica de “Trypan blue”, e também a presença de agentes contaminantes. Em seguida, as formas promastigotas foram recuperadas por centrifugação a 800 x g, durante 10 minutos a 18°C e submetidas a duas lavagens com PBS 1X. Posteriormente, foi realizado o ajuste da concentração celular para aproximadamente 10<sup>8</sup> parasitos/mL. Para obtenção do LSA, os parasitos foram submetidos a três processos de congelamento (-70°C) e descongelamento (37°C), intercalados com processos de sonicação por 30 segundos, utilizando-se homogeneizador de tecido com pistão de teflon (Wirtis, DT). Posteriormente, o lisado de parasitos foi centrifugado a 37.000 x g, durante 90 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS 1X, durante 72 horas a 4°C e, em seguida, esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0,22  $\mu$ m (Filter millex HA, E.U.A.). O conteúdo protéico presente na preparação do antígeno solúvel de *Leishmania* foi determinado pelo método descrito por Lowry et al. (1951). A preparação antigênica foi conservada a -70°C em alíquotas (concentração de 325  $\mu$ g/mL) para uso posterior nos ensaios de avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos

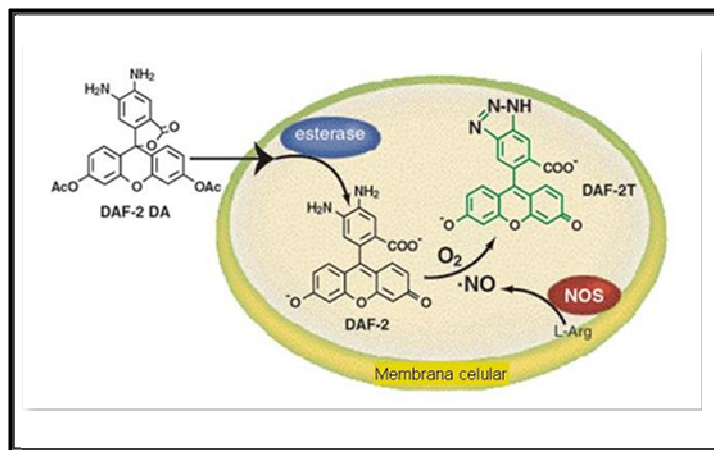
do sangue periférico após estimulação *in vitro* com antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*.

#### 4.6.2 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico, após estimulação *in vitro* com antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*

A determinação de NO em amostras biológicas constitui um desafio devido principalmente à ínfima meia-vida desse composto, cerca de quatro a seis segundos no plasma e dez a sessenta segundos nos tecidos (Kiechle, Malinski, 1993). Diversos métodos utilizando as mais avançadas tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente, por meio de ensaios que reflitam a sua presença. A determinação direta pode ser feita por ressonância eletrônica paramagnética (EPR), quimioluminescência e detecção eletroquímica através de sensores (Archer, 1993).

A medida indireta de NO é frequentemente feita pela reação de Griess, onde seus metabólitos estáveis, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) são avaliados. Esta metodologia pressupõe a redução prévia do nitrato a nitrito, utilizando-se a enzima nitrato redutase ou cádmio e a posterior determinação do nitrito pela reação de Griess (Tsikas, 2007).

Recentemente, foi proposta a determinação de NO intracelular por citometria de fluxo, utilizando-se o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) (Strijdom et al., 2004). Tal metodologia é baseada na capacidade do NO de oxidar o 4,5-diaminofluoresceína não-fluorescente para uma forma fluorescente (DAF-2T) (Figura 14). A medida da fluorescência é feita pela leitura da amostra no citômetro de fluxo e é proporcional à concentração de NO nas células (Havenga et al., 2001).



**Figura 14:** Oxidação do DAF-2DA para uma forma fluorescente DAF-2T através da ação de esterases na presença de NO (Fonte: SCHACHNIK, 2008)

Para a realização dos ensaios, foi feita a coleta de sangue dos participante sem tubos contendo EDTA para a realização do hemograma e em tubos contendo heparina para a realização dos experimentos. Inicialmente a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL. Após remoção do plasma adicionou-se PBS 1X suplementado com 2% de albumina sérica bovina (BSA) (mesmo volume de plasma retirado). Em seguida, realizou-se culturas de curta duração em tubos de polipropileno de 5 mL, como descrito abaixo:

- 1) **Controle da reação:** 30  $\mu$ L PBS 1X 2% BSA + 100  $\mu$ L de amostra (as amostras foram incubadas por 3 horas em estufa 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).
- 2) **Controle positivo (indutor da síntese de NO):** 10  $\mu$ L de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) 100  $\mu$ g/mL + 100  $\mu$ L de amostra (as amostras foram incubadas por 1 hora em estufa 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, acrescentou-se 20  $\mu$ L de DAF-2DA 10 $\mu$ M (Sigma, E.U.A.) e os tubos foram mantidos por mais 3 horas em estufa nas condições já mencionadas.
- 3) **Controle de especificidade (inibidor da síntese de NO):** 10  $\mu$ L de aminoguanidina (AG - Sigma, E.U.A.) 1M + 100 $\mu$ L de amostra (as amostras foram incubadas por 10 minutos em estufa 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, acrescentou-se 20  $\mu$ L de DAF-2DA 10  $\mu$ M e os tubos foram mantidos por mais 3 horas e cinquenta minutos em estufa nas condições já mencionadas.
- 4) **Estímulo específico (antígeno bruto de formas promastigotas de L. (V.) braziliensis - LSA):** 10  $\mu$ L de antígeno 325  $\mu$ g/mL + 100  $\mu$ L de amostra (as amostras foram incubadas por 1 hora em estufa 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

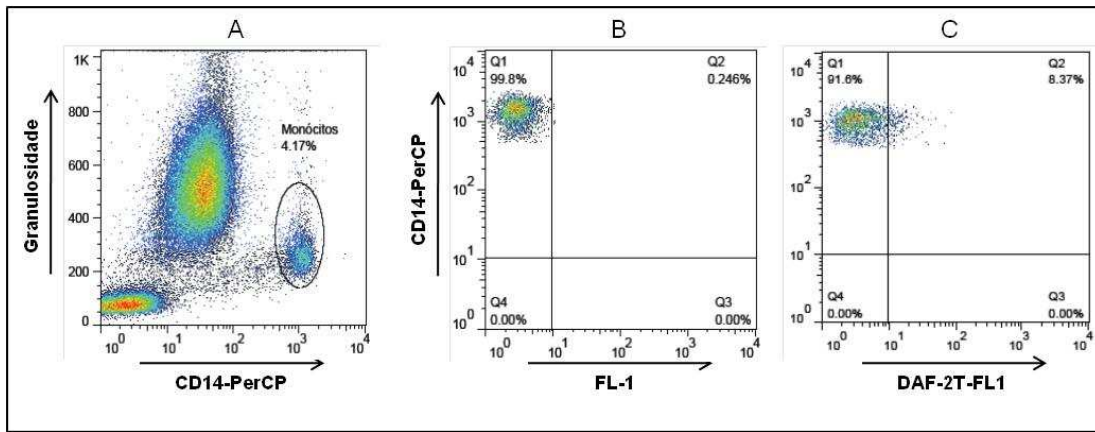
Posteriormente, acrescentou-se 20  $\mu\text{L}$  de DAF-2DA 10  $\mu\text{M}$  e os tubos foram mantidos por mais 3 horas em estufa nas condições já mencionadas.

5) **Produção basal:** 10  $\mu\text{L}$  de PBS 1X 2% BSA + 20  $\mu\text{L}$  DAF-2DA 10  $\mu\text{M}$  + 100  $\mu\text{L}$  de amostra (as amostras foram incubadas por 4 horas em estufa 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ ).

Além disso, é importante mencionar que foi feito um tubo controle para cada estímulo, ou seja, um tubo na ausência do reagente DAF-2DA, com intuito de avaliar possíveis reações inespecíficas. Um total de 3.000 monócitos foram adquiridos e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo FACScan, Becton Dickson – BD.

#### *4.6.3 Aquisição e análise do perfil de produção de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico*

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> foram realizadas pelo software FlowJo. A figura 16 representa o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia (Figura 15A) consistiu na identificação da população de monócitos. A figura 15B representa o perfil de monócitos na ausência do reagente DAF-2DA. Já a figura 15C ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção de monócitos produtores de NO, em gráfico defluorescência-1 (FL1, DAF-2T) *versus* fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP).



**Figura 15:** Análise do perfil de produção de NO por monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. (A) representa o perfil celular da população de monócitos, selecionada na janela “gate” monócitos em gráfico de granulosidade em função da fluorescência-3 (CD14-PerCP). (B) representa o perfil de análise da população de monócitos na ausência do reagente DAF-2DA em gráfico de fluorescência-1 (FL-1) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP). (C) representa o perfil de análise da população de monócitos produtores de NO (DAF-2T<sup>+</sup>) no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de fluorescência-1 (DAF-2T) versus fluorescência-3 (CD14-PerCP).

## 4.7 Quantificação dos níveis séricos de IgE total

### 4.7.1 Níveis séricos de IgE total

A dosagem dos níveis séricos de IgE das amostras foi feita utilizando-se o kit Human IgE ELISA (Bethyl Laboratories, Inc.). Este kit é baseado na técnica ELISA sanduíche. A IgE humana (hIgE) presente na amostra testada é capturada pelo anticorpo anti-IgE humana que é pré-absorvido na superfície dos poços de microtitulação. Depois da ligação da amostra, proteínas e moléculas que não foram ligadas são lavadas e o anticorpo de detecção biotilado foi adicionado aos poços para se ligar à hIgE capturada. A AS-HRP foi adicionada em seguida para catalisar uma reação colorimétrica com o substrato cromogênico TMB. A reação colorimétrica gerou um produto azul, que se tornou amarelo quando a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico diluído. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nm, conforme recomendação do fabricante.

## 4.8 Identificação do perfil de resistência/susceptibilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* ao óxido nítrico

### 4.8.1 Identificação de isolados de *L. (V.) braziliensis* resistentes/susceptíveis ao óxido nítrico através do método do MTT

Amostras isoladas em culturas provenientes de fragmentos de biópsia ou aspirados de lesão foram submetidas a ensaios de viabilidade para avaliar a resistência/susceptibilidade da *L. (V.) braziliensis* ao NO (Tabela 2). Os isolados foram previamente identificados por métodos bioquímicos e/ou moleculares como *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Para este ensaio, foi empregado protocolo descrito por Giudice et al. (2007), adaptado. Utilizou-se o método do MTT (Sigma-Aldrich), que se baseia na conversão deste sal de cor amarelada em um composto formazan, de cor lilás ou acastanhada, formado pela clivagem do grupo tetrazolium pela enzima desidrogenase. A conversão para a cor lilás ocorre quando ainda há atividade mitocondrial, ou seja, quando não houver morte de parasitos na presença do NO. Desta forma, é possível avaliar e identificar possíveis cepas resistentes.

Para isso, culturas de isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de fragmentos de biópsia ou aspirado de lesão de indivíduos da Terra Indígena Xakriabá, foram centrifugadas a 620 x g, 4°C, durante 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, as amostras foram lavadas duas vezes com Solução de Hanks pH 5.0 (HBSS/ Sigma-Aldrich), centrifugando-se a 3900 x g, 4°C por 5 minutos. Em seguida, foi feito o ajuste para  $1 \times 10^8$  parasitos/mL.

Primeiramente, foram pipetados 180 µL de HBSS pH 5.0 em cada poço da placa. Para iniciar a diluição, na última fileira horizontal de poços foi colocado 360 µL de Nitrito de Sódio (NaNO<sub>2</sub>/Sigma-Aldrich) na concentração de 1M. Retirou-se 180 µL e passou para a fileira de poços seguinte, homogeneizando-se bem, e assim por diante, correspondendo então às diluições 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 mM, respectivamente. Um poço controle (sem NaNO<sub>2</sub>) foi adicionado ao experimento, além da utilização da cepa referência M2903 para construção da curva padrão.

Logo em seguida 100 µL de parasitos ( $10^7$  parasitos por poço) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 4 horas a 24°C. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 620 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante retirado, vertendo-se a placa. Em seguida, adicionou-se 90 µL de HBSS pH 7.0 em cada

poço e 20 µL de MTT, previamente preparado. Uma nova incubação de 4 horas foi realizada, alterando-se a temperatura para 37°C, para um melhor funcionamento do MTT.

A reação foi parada adicionando-se 100 µL de HCl/Isopropanol em cada um dos poços, homogeneizando-se bem para solubilizar os cristais formados. Em seguida, a placa foi lida em espectrofotômetro SpectraMax M5 com comprimento de onda de 492 nm. Os arquivos de análise foram gerados a partir do software SoftMax Pro 5.3.

## 4.9 Análise Estatística

### 4.9.1 Caracterização do perfil de expressão do marcador de superfície CD23 por monócitos, das citocinas IFN-γ e IL-4 por linfócitos e do perfil de produção de NO por monócitos

As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, E.UA., versão 5.00). Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste T de Student para dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para dados não paramétricos. Para a análise comparativa entre três grupos foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns para dados não paramétricos. Para verificar a existência de correlações entre os parâmetros avaliados, foi empregado o teste de correlação de Spearman. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05.

### 4.9.2 Quantificação dos níveis séricos de IgE total

As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, E.UA., versão 5.00). A curva padrão foi estabelecida através da regressão não-linear, utilizando-se a equação quarto parâmetro logístico representada abaixo:

$$y = ((A-D)/(1+(x/C)^B))+D$$

Após plotagem das absorbâncias obtidas no ensaio e obtenção das concentrações de IgE total sérico, foi feita a análise comparativa entre os grupos como descrito no item 4.9.1.



#### **4.10 Análise do perfil panorâmico de biomarcadores**

Para a análise do perfil panorâmico dos biomarcadores avaliados (NO, IFN- $\gamma$ , IL-4 e CD23), a seguinte estratégia foi adotada:

- 1º- Quantificação do % de células biomarcadores<sup>+</sup> para cada subpopulação celular estudada nas culturas não estimuladas e estimuladas com *L. (V.) braziliensis* ou ASL (no caso do NO);
- 2º- Cálculo do ponto de corte para segregar baixo e alto produtores, empregando a mediana global, ou seja, mediana de cada biomarcador considerando os grupos de estudo (CT, TM<sup>+</sup>, LCL, LCL<60 e LCL>60);
- 3º- Categorização de baixo e alto produtores através dos valores observados para as medianas globais de cada biomarcador do grupo;
- 4º- Determinação da razão entre alto produtores da cultura controle e cultura estimulada com *L. (V.) braziliensis* para cada grupo de estudo;
- 5º- Cálculo da frequência de alto produtores para cada biomarcador em cada grupo de estudo, considerando a subpopulação celular produtora. Para tanto, foi necessário determinar o número de indivíduos alto produtores, dividir pelo total de indivíduos do grupo e multiplicar por 100;
- 6º- Determinação da assinatura de biomarcadores. A assinatura ascendente de biomarcadores do grupo controle (CT) foi estabelecida como curva de referência para comparação aos demais grupos.
- 7º- As assinaturas de biomarcadores obtidas das razões entre cultura controle (não estimulada) e cultura estimulada com *L. (V.) braziliensis* foram comparadas pela sobreposição da curva ascendente de referência (curva do grupo controle – CT). As diferenças foram consideradas “relevantes” quando a frequência de determinado biomarcador ultrapassou ( $\uparrow$ ) o percentil 50, desde que tenha ultrapassado também o quartil da curva de referência.

#### **4.11 Identificação do perfil de resistência/susptibilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* ao óxido nítrico**

##### *4.11.1 Determinação de IC50*

A determinação da IC50 para os isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes responsivos e refratários ao tratamento com Glucantime® foi feita com o auxílio do

Software GraphPad Prism (San Diego, E.UA., versão 5.00). Inicialmente as concentrações de NaNO<sub>2</sub> foram transformadas em LogX e, em seguida, uma análise de regressão não linear foi realizada, utilizando-se uma equação de dose-resposta por inibição (Log inibidor versus resposta – quatro parâmetros), para calcular a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para produzir 50% de redução da viabilidade celular (IC50).

#### 4.11.2 Cálculo do percentual de inibição da viabilidade

Para cálculo do percentual de inibição da viabilidade, que consiste numa estratégia alternativa ao cálculo do IC50, utilizou-se os valores das absorbâncias obtidos nas diferentes concentrações de NaNO<sub>2</sub>. Os valores de absorbância obtidos para os isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes responsivos e refratários ao tratamento com Glucantime® nas culturas sem NaNO<sub>2</sub>, foram convertidos em percentual de viabilidade celular, correspondente a 100% de viabilidade, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição da Viabilidade} = 100 - (Am \times 100) / Am_{cont}$$

em que *Am* significa a média dos valores de absorbância de cada paciente nas diferentes concentrações de NaNO<sub>2</sub> e *Am<sub>cont</sub>* a média dos valores de absorbância na concentração 0, ou seja, na ausência de NaNO<sub>2</sub>.

A partir dos resultados do percentual de inibição da viabilidade, foi possível estabelecer a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para produzir 50% de redução da viabilidade celular.

## 5 RESULTADOS

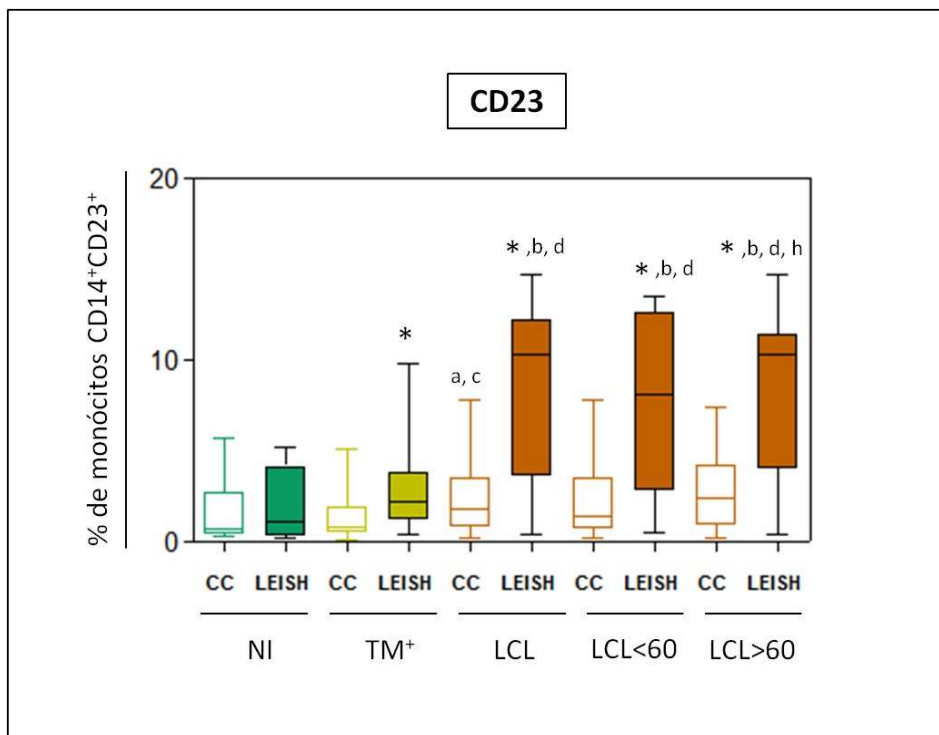
### **5.1 Avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 por monócitos do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de LCL, considerando o tempo de evolução da lesão na presença ou ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis***

#### *5.1.1 Avaliação do perfil de expressão do marcador de superfície celular CD23 por monócitos do sangue periférico de indivíduos NI, TM<sup>+</sup> e portadores de LCL, separados por tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis**

A molécula de ativação CD23 foi analisada pelo valor percentual de monócitos positivos para esse marcador (Figura 16).

No grupo TM<sup>+</sup>, a cultura estimulada apresentou aumento significativo do percentual de células CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> em relação à cultura sem estímulo do mesmo grupo. O mesmo ocorreu no grupo LCL, havendo maior expressão de CD23 por monócitos na cultura estimulada em relação à cultura controle. Ainda no grupo LCL, a cultura estimulada apresentou aumento significativo quando comparada às culturas estimuladas dos grupos NI e TM<sup>+</sup>. Foi possível observar também aumento significativo de células CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> na cultura controle do grupo LCL em relação às culturas controle dos grupos NI e TM<sup>+</sup>.

Para avaliação segundo o tempo de evolução da lesão, os indivíduos do grupo LCL foram divididos em dois grupos, LCL<60 dias (lesão recente) e LCL>60 dias (lesão tardia). A cultura estimulada do grupo LCL<60 apresentou maior percentual de células CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> em relação à cultura controle do mesmo grupo e em relação às culturas estimuladas dos grupos NI e TM<sup>+</sup>. Já o grupo LCL>60 apresentou maior percentual de monócitos CD23<sup>+</sup> em sua cultura estimulada, quando comparado à cultura controle do mesmo grupo e também em relação à cultura estimulada dos grupos NI, TM<sup>+</sup> e LCL<60.



**Figura 16:** Avaliação do perfil de expressão da molécula de ativação CD23 por monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60) estão representadas pelas letras *a, c, b, d, h*. Já as diferenças estatisticamente significativas entre as culturas na ausência (CC) ou presença (LEISH) de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* estão representadas por asterisco (\*).

## 5.2 Avaliação do perfil de expressão intracelular das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de LCL, considerando o tempo de evolução da lesão na presença ou ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

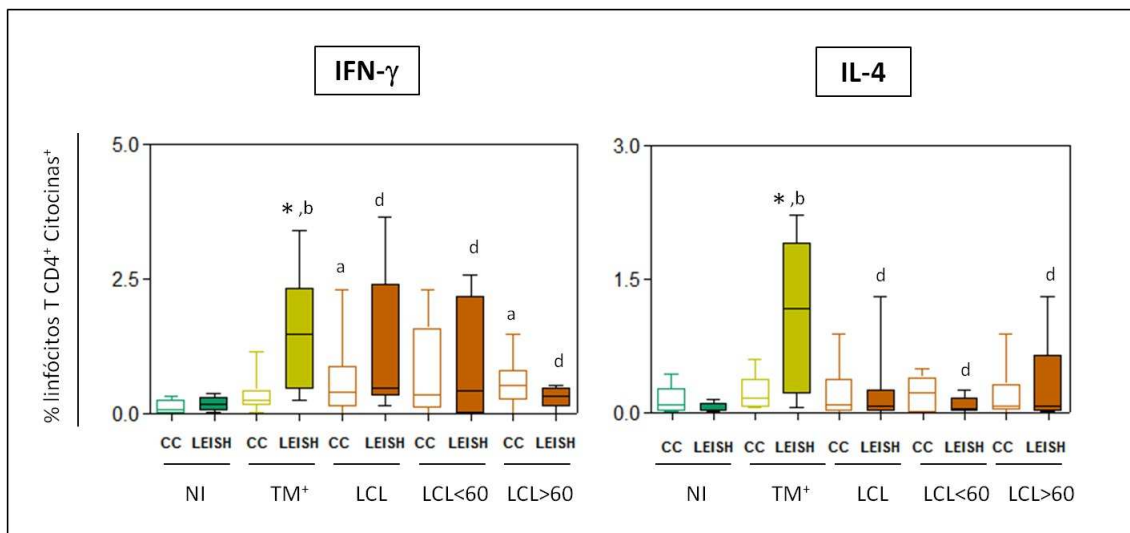
### 5.2.1 Avaliação do perfil de expressão intracelular das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos NI, TM<sup>+</sup> e portadores de LCL, divididos por tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

As figuras 18 e 19 representam os resultados referentes ao percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup> e o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup>, respectivamente. A análise dos dados mostrou aumento estatisticamente significativo de linfócitos TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no grupo TM<sup>+</sup>, cultura estimulada (LEISH), em relação à cultura controle (CC) do mesmo grupo e em relação à cultura estimulada do grupo NI.

Além disso, podemos destacar uma diminuição significativa na expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> na cultura estimulada do grupo LCL em relação à cultura estimulada do grupo TM<sup>+</sup>. Ainda no grupo LCL, na cultura controle, verificamos um aumento na expressão de IFN- $\gamma$  em relação à cultura controle do grupo NI (Figura 17).

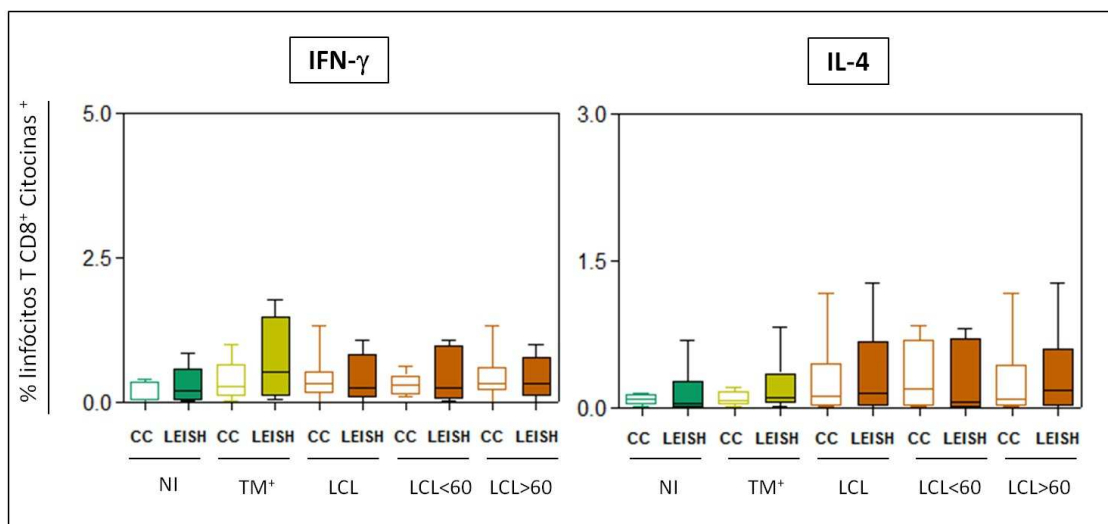
Para avaliação segundo o tempo de evolução da lesão, os indivíduos do grupo clínico foram divididos em dois grupos, LCL<60 dias (lesão recente) e LCL>60 dias (lesão tardia). Foi observado uma diminuição significativa da citocina IFN- $\gamma$  na cultura estimulada do grupo LCL, LCL<60 e LCL>60 em relação à cultura estimulada do grupo TM<sup>+</sup>. Podemos destacar também uma diferença significativa na expressão de IFN- $\gamma$  na cultura controle do grupo LCL>60 em relação à cultura controle do grupo NI.

Já na análise da expressão de IL-4 por linfócitos TCD4<sup>+</sup>, houve aumento estatisticamente significativo da expressão dessa citocina na cultura estimulada do grupo TM<sup>+</sup> em relação à cultura controle do mesmo grupo e em relação à cultura estimulada do grupo NI. Os dados demonstraram ainda diminuição estatisticamente significativa da expressão de IL-4 por linfócitos TCD4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas dos grupos LCL, LCL<60 e LCL>60 quando comparadas à cultura estimulada do grupo TM<sup>+</sup>.



**Figura 17:** Avaliação do perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos dos grupos controle (CT), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>citocinas<sup>+</sup> em gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos controle (CT), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60) estão representadas pelas letras *a*, *b*, *d*. Já as diferenças estatisticamente significativas entre as culturas na ausência (CC) ou presença (LEISH) de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* estão representadas por asterisco (\*).

Após análise do perfil de expressão de citocinas na subpopulação de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, foi analisado o perfil de expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos TCD8<sup>+</sup>. As análises dos dados demonstraram que tanto na presença quanto na ausência de estímulo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, TM<sup>+</sup> e LCL avaliados (Figura 18).



**Figura 18:** Avaliação do perfil de expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>) Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>citocinas<sup>+</sup> em gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

### 5.3 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos Não Infectados (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de LCL, considerando o tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

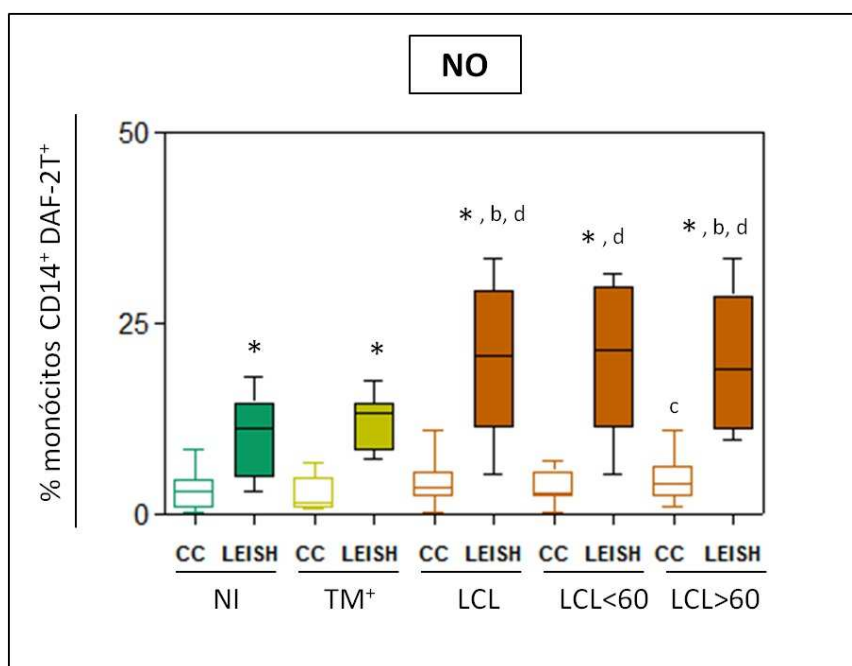
#### 5.3.1 Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos NI, TM<sup>+</sup> e portadores de LCL, divididos por tempo de evolução da lesão, na presença ou ausência de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

A produção de NO intracelular foi analisada pelo percentual de células CD14 positivas para DAF-2T (Figura 19).

Como controle positivo da reação, foi utilizado o estímulo com LPS, para assegurar o aumento da produção de NO na presença de um antígeno indutor de NO. As culturas estimuladas com LPS dos três grupos de pacientes apresentaram aumento significativo no percentual de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup>. Já como controle de

especificidade, foi utilizada a aminoguanidina (AG), que inibiu significativamente a produção de NO nas culturas dos três grupos de pacientes estimuladas por esta molécula (dados não mostrados).

A análise dos resultados mostrou que houve aumento estatisticamente significativo de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> nas culturas estimuladas em todos os grupos (NI, TM<sup>+</sup>, LCL, LCL<60 e LCL>60) em relação às culturas controle. Houve também aumento significativo de monócitos CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> na cultura estimulada do grupo LCL em relação à cultura estimulada dos grupos NI e TM<sup>+</sup>. Além disso, podemos destacar também um aumento significativo na produção de NO por monócitos da cultura estimulada do grupo LCL<60 em relação aos monócitos da cultura estimulada do grupo TM<sup>+</sup>. Já no grupo LCL>60, além de observar aumento significativo de monócitos CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> na cultura estimulada em relação à cultura estimulada do grupo TM<sup>+</sup> e do grupo NI, observamos na cultura sem estímulo, um aumento na produção de NO por monócitos em relação à cultura não estimulada do grupo NI



**Figura 19:** Avaliação dos níveis de NO intracelular em monócitos do sangue periférico de indivíduos dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60). Os resultados estão apresentados como percentual de células CD14<sup>+</sup>DAF-2T<sup>+</sup> em gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>) e clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60) estão representadas pelas letras *b*, *c*, *d*. Já as diferenças estatisticamente significativas entre a cultura controle (CC) e a cultura estimulada com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* (LEISH) estão representadas por asterisco (\*).

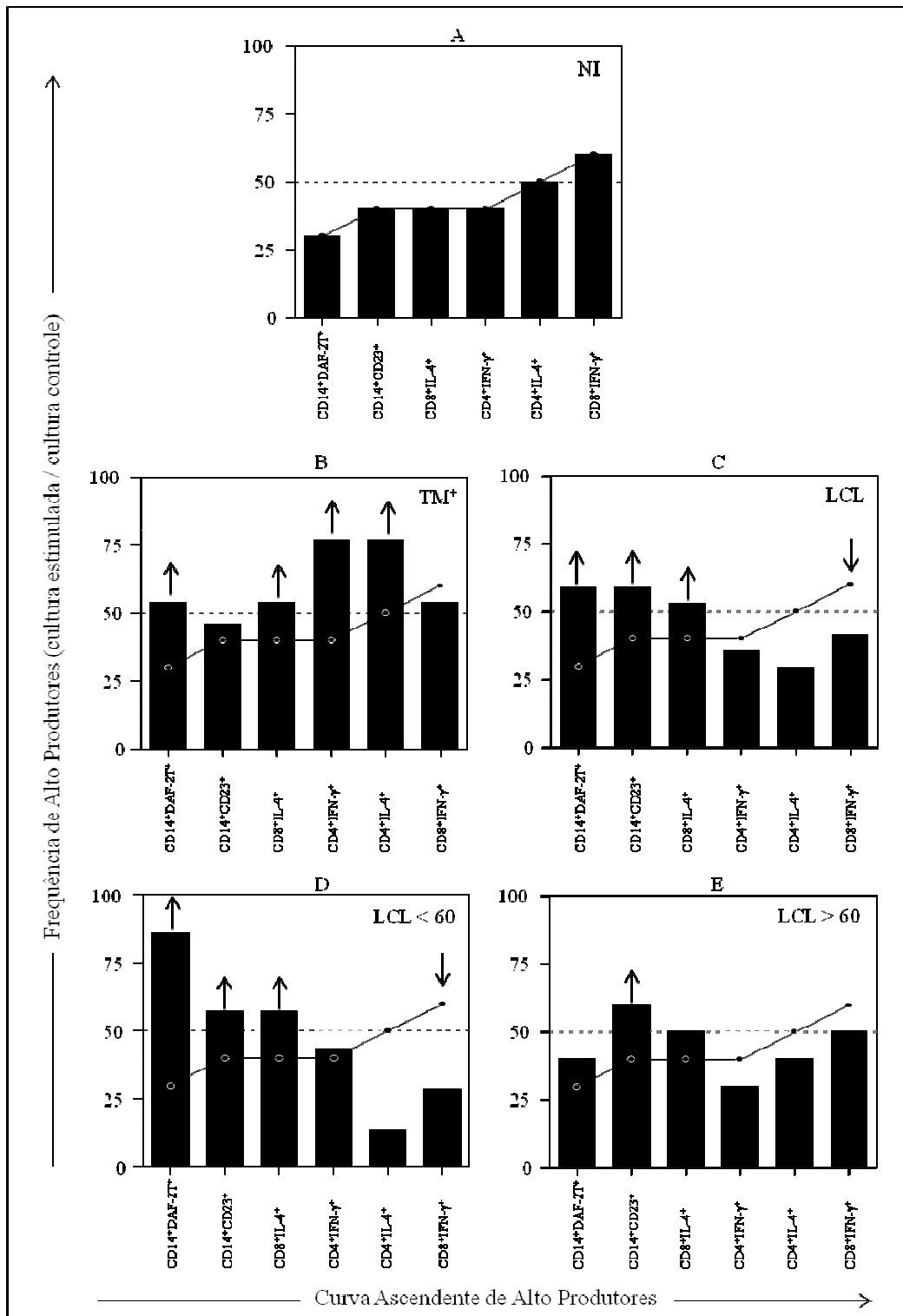
#### **5.4 Análise do perfil panorâmico de biomarcadores imunológicos em indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), considerando o tempo de evolução da lesão**

Após análise do perfil de expressão de CD23 por monócitos, IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos e do perfil de produção de NO por monócitos do sangue periférico de indivíduos NI, TM<sup>+</sup> e portadores de LCL, foi de nosso interesse, avaliar o impacto da estimulação com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* ou com o antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* na expressão desses biomarcadores nos grupos do estudo, através de uma análise do perfil global/panorâmico de expressão desses biomarcadores, considerando a frequência de alto produtores. Para tanto, foi utilizada uma estratégia alternativa, não convencional, que emprega uma análise de dados de natureza categórica, observacional, sem a aplicação de métodos estatísticos convencionais, como descrito por Luiza-Silva et al. (2011). Sendo assim, as diferenças entre grupos não foram denominadas "significativas" mas sim "relevantes" quando contemplaram os critérios de interpretação propostos. Os critérios basearam-se na análise da frequência de observações, empregando o percentil 50 como linha de segregação. Situações em que as frequências de observações se localizaram em lados opostos do percentil 50 foram consideradas como diferenças relevantes. A assinatura ascendente de biomarcadores do grupo controle, não infectado (NI), foi utilizada como curva de referência para comparação aos demais grupos.

A análise das assinaturas de biomarcadores demonstrou que indivíduos TM<sup>+</sup> apresentam maior frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> alto produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4, linfócitos TCD8<sup>+</sup> alto produtores de IL-4 e monócitos alto produtores de NO, quando comparados ao grupo NI (Figura 20B). No grupo LCL foi possível observar, menor frequência de linfócitos TCD8<sup>+</sup> alto produtores de IFN- $\gamma$  e maior frequência de linfócitos TCD8<sup>+</sup> alto produtores de IL-4, monócitos alto produtores de NO e monócitos com elevada expressão de CD23 (Figura 20 C).

Quando avaliamos os pacientes do grupo LCL, considerando o tempo de evolução da lesão, foi possível observar que o grupo LCL<60 apresentou menor frequência de linfócitos TCD8<sup>+</sup> alto produtores de IFN- $\gamma$  e maior frequência de linfócitos TCD8<sup>+</sup> alto produtores de IL-4, monócitos alto produtores de NO e monócitos com elevada expressão de CD23 (Figura 20D). Já o grupo LCL>60 apresentou maior frequência de monócitos alto produtores de CD23 (Figura 20E).





**Figura 20:** Comparação das assinaturas de biomarcadores após estímulo com *L. (V.) braziliensis* ou antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis*. (A, B, C, D e E) Frequência de alto produtores dos grupos Não Infectado (NI), Teste de Montenegro Positivo sem Lesão (TM<sup>+</sup>), Clínico (LCL), Clínico Lesão Recente (LCL<60) e Clínico Lesão Tardia (LCL>60), respectivamente. A análise comparativa foi realizada utilizando a curva ascendente de biomarcadores do grupo controle como referência. Situações em que as frequências de observações se localizaram em lados opostos do percentil 50 foram consideradas como diferenças relevantes.

### **5.5 Análise de correlação entre a expressão do marcador de superfície CD23, citocinas IFN- $\gamma$ e IL-4 e os níveis de óxido nítrico intracelular em indivíduos não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), considerando o tempo de evolução da lesão**

A análise de correlação é um indicador que atende à necessidade de se estabelecer a existência ou não de uma relação entre variáveis. Assim, com o objetivo de avaliar possíveis relações entre as variáveis estudadas, foi feito o teste de correlação de *Spearman*.

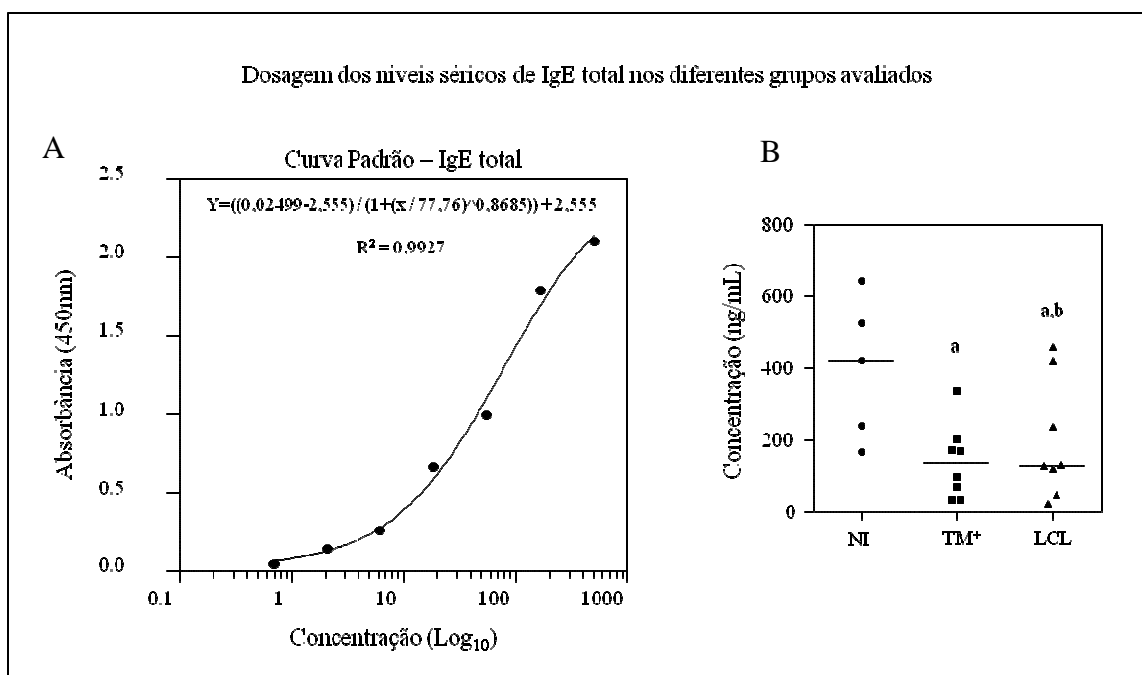
A análise correlacional demonstrou no grupo NI, na cultura controle (CC) correlação forte e positiva entre CD23 e NO ( $r = 0.85$ ,  $p = 0.0037$ ) e entre IL-4 e IFN- $\gamma$  ( $r = 0.85$ ,  $p = 0.0029$ ). Já no grupo NI, cultura estimulada (LEISH), houve correlação moderada e positiva entre IL-4 e IFN- $\gamma$  ( $r = 0.67$ ,  $p = 0.039$ ) e correlação forte e negativa entre CD23 e IFN- $\gamma$  ( $r = -0.71$ ,  $p = 0.0268$ ). Já no grupo TM<sup>+</sup>, cultura controle (CC), houve correlação forte e positiva entre CD23 e NO ( $r = 0.72$ ,  $p = 0.0055$ ). Quando estimulado, o grupo TM<sup>+</sup> apresentou correlação moderada e positiva entre IL-4 e IFN- $\gamma$  ( $r = 0.60$ ,  $p = 0.0287$ ) e correlação forte e positiva entre CD23 e NO ( $r = 0.78$ ,  $p = 0.0017$ ). Os grupos LCL lesão recente e LCL lesão tardia não apresentaram correlações estatisticamente significativas.

### **5.6 Dosagem dos níveis séricos de IgE total em indivíduos não infectados (CT), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL)**

A dosagem dos níveis de IgE total foi realizada em 39 amostras de soro de indivíduos dos grupos LCL ( $n=16$ ), TM<sup>+</sup> ( $n=13$ ) e NI ( $n=10$ ).

Utilizando-se a equação do quarto parâmetro logístico, foi possível chegar à equação da reta correspondente à curva padrão gerada, obtendo-se o valor de  $R^2=0,9927$  (Figura 21A). Das 39 amostras de soro incluídas no estudo, 16 amostras foram excluídas, pois obtiveram leitura de absorvância superior ao valor máximo de absorvância da curva padrão. Na Tabela 7 estão mostrados os valores da concentração de IgE das 23 amostras avaliadas.

A análise dos dados demonstrou que o grupo LCL apresentou menor concentração de IgE total sérica quando comparado aos grupos NI e TM<sup>+</sup>. Observou-se ainda menor concentração de IgE total sérica nas amostras do grupo TM<sup>+</sup> quando comparado ao grupo NI (Figura 21B).

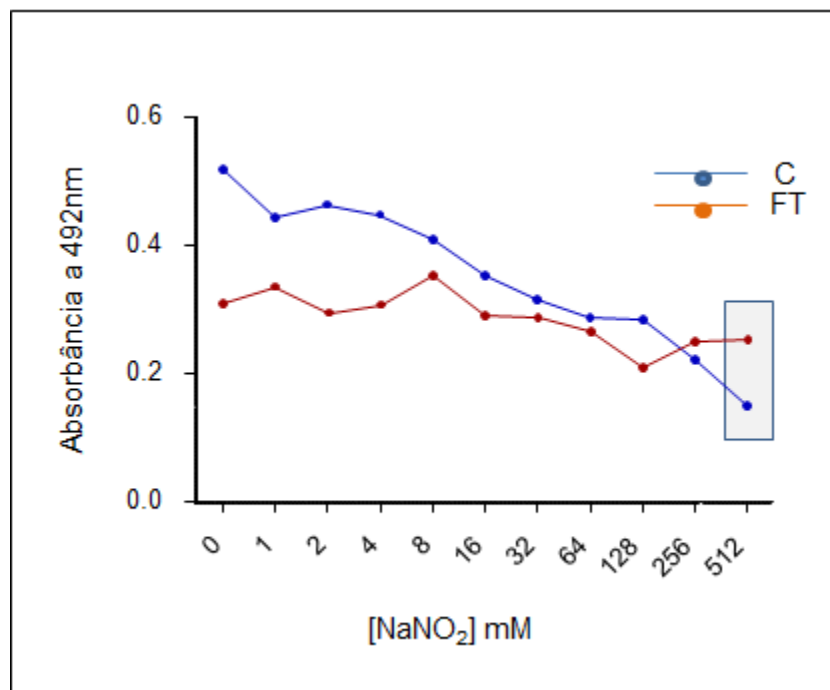


**Figura 21:** Dosagem dos níveis séricos de IgE total nos diferentes grupos avaliados. O gráfico A corresponde à curva padrão e o gráfico B às concentrações de IgE total (ng/mL) no grupo NI, TM<sup>+</sup> e LCL. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão demonstradas pelas letras *a* e *b*.

### 5.7 Identificação de cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes/susceptíveis ao óxido nítrico

A viabilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de cultura de fragmento de biópsia ou aspirado de lesão de 10 portadores de LCL da Terra Indígena Xakriabá foi avaliada pelo método do MTT. Dos 10 isolados testados, 5 foram provenientes de indivíduos que não obtiveram sucesso no primeiro ciclo de tratamento e/ou apresentaram recidiva após a cicatrização da lesão. Os outros 5 isolados avaliados foram obtidos de pacientes que obtiveram sucesso no tratamento, sendo constatada a cura clínica após 90 dias do tratamento com 20 doses do Glucantime®.

A Figura 22 mostra as médias das absorvâncias (médias de cada grupo) referentes à avaliação do comportamento dos isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes responsivos (C) e refratários (FT) ao tratamento com Glucantime® expostos a concentrações variadas de NaNO<sub>2</sub>. Foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e FT na concentração de 512 mM, onde pacientes refratários ao tratamento com Glucantime® foram mais resistentes ao NO quando comparados aos isolados de pacientes responsivos.



**Figura 22:** Médias das absorbâncias referentes à avaliação do comportamento de isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes responsivos (C) e refratários (FT) ao tratamento com Glucantime® expostos a concentrações variadas de NaNO<sub>2</sub>, por MTT. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos C e FT na concentração de 512 mM.

Após análise geral do comportamento dos isolados de *L. (V.) braziliensis* frente a exposição à diferentes concentrações de NaNO<sub>2</sub>, foi de nosso interesse, determinar a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para produzir 50% de redução da viabilidade celular. Para tanto, o cálculo da IC<sub>50</sub>, foi determinada.

Nossos dados não apresentaram perfil dose-dependente, assim, não foi possível a determinação da IC<sub>50</sub> para nenhum dos 10 isolados, considerando as concentrações de NaNO<sub>2</sub> utilizadas em nosso trabalho. As curvas, quando obtidas, não apresentaram perfil sigmóide característico para definição segura da IC<sub>50</sub>.

Considerando os resultados obtidos para determinação da IC<sub>50</sub>, optamos por avaliar o percentual de inibição da viabilidade dos isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes responsivos e refratários ao tratamento com Glucantime® expostos a diferentes concentrações de NaNO<sub>2</sub>. A determinação do percentual de inibição da viabilidade possibilita estabelecer a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para inibição de 50% da viabilidade celular (Tabela 7). Os resultados demonstraram que apenas para os isolados dos pacientes 426 e 387, responsivos ao tratamento com Glucantime®, foi possível estabelecer a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para inibir 50% da viabilidade celular.

**Tabela 7:** Percentual de viabilidade dos isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes responsivos e refratários ao tratamento com Glucantime® expostos a diferentes concentrações de NaNO<sub>2</sub>.

ID	Grupo	[NaNO <sub>2</sub> ] mM de inibição de 50% da viabilidade celular
426	C	64
387	C	128
316	C	>512
396	C	>512
327	C	>512
416	FT	>512
339	FT	>512
390	FT	>512
340	FT	>512
370	FT	>512

ID = Identificação do paciente; C = responsivos; FT = refratários.

## 6 DISCUSSÃO

### *Perfil Imunológico*

Na leishmaniose cutânea localizada humana, tem sido demonstrado que, diferentes formas clínicas da doença, apresentam características imunológicas distintas, sugerindo que a resposta imune possa estar associada tanto com a progressão da infecção, com o controle e resistência ao parasito como também com a espécie de *Leishmania* causadora da infecção.

No processo de desenvolvimento da resposta imune anti-*Leishmania*, ocorre a secreção de fatores solúveis como citocinas e quimiocinas, associada ao recrutamento dos monócitos circulantes, que no foco inflamatório se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos são células centrais nas leishmanioses, pois são células alvo para os parasitos, permitindo o seu desenvolvimento. O papel desempenhado por estas células depende do tipo de ativação e da vulnerabilidade do parasito diante dos mecanismos efetores (Horta et al., 2012). A sobrevivência das leishmanias intracelulares está relacionada à sua capacidade de evitar a ativação dos macrófagos (Kemp, 1997). Uma vez ativadas, essas células são capazes de destruir os parasitos, principalmente via produção de NO e reativos intermediários do oxigênio (RIOs) (Horta et al., 2012).

A habilidade do hospedeiro em controlar a infecção e resolver a doença requer a geração de uma resposta imune mediada por células capaz de ativar macrófagos e eliminar os parasitos intracelulares. Na infecção humana e em modelos experimentais de LCL, o controle da infecção é mediado por linfócitos T e depende da indução de uma resposta imune Th1 dirigida por IL-12, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esta citocina desempenha um papel crítico na ativação de macrófagos e na morte de parasitos intracelulares através da indução da produção de NO, crucial na morte de *Leishmania* (Cummings et al., 2010).

O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Nesse contexto, sua importância biológica deve-se ao fato dessa molécula ter a capacidade de ativar ou inibir moléculas-alvo em diferentes processos como, regulação do tônus vascular, resposta imunológica e neurotransmissão (Rathel et al. 2003, Barreto et al. 2005). Guzik e colaboradores (2003) demonstraram que durante o desenvolvimento de um processo inflamatório ocorre síntese de grandes quantidades de NO via iNOS (enzima óxido nítrico sintase induzida que catalisa a formação de NO). Esse NO produzido, principalmente por macrófagos ativados, possui ação citotóxica e citostática, promovendo destruição de microorganismos e células tumorais (Guzik et al.

2003). Como mencionando acima, na leishmaniose o NO tem papel crucial, uma vez que está associado à destruição dos parasitos e, conseqüentemente, ao controle da infecção.

Trabalhos na literatura, têm demonstrado que o tratamento de monócitos/macrófagos humanos com IFN- $\gamma$  e IL-4, aumenta a expressão do CD23, receptor de baixa afinidade para IgE (Vouldoukis et al., 1995; Mossalayi et al., 1999; Paul-Eugène et al., 1995). A ligação do CD23 ao seu ligante, aumenta a transcrição do mRNA da iNOS (Óxido nítrico sintase induzida), bem como a produção de NO (Paul-Eugène et al., 1995). Estudos realizados com *Leishmania major* mostraram que após o tratamento de monócitos/macrófagos humanos com IFN- $\gamma$  e IL-4, a infecção não se estabeleceu e, os parasitos, ao entrarem na célula foram imediatamente destruídos pelo NO, sugerindo um papel protetor deste mecanismo (Vouldoukis et al., 1994; Vouldoukis et al., 1995).

A molécula CD23 é um receptor de IgE de baixa afinidade que desempenha importante papel em vários contextos da resposta imune, inclusive na resposta alérgica (Delespesse et al., 1991; Gordon, 1994). Monócitos/macrófagos humanos, após estimulação com várias citocinas, como IL-4, IL-13 ou IFN- $\gamma$ , passam a expressar a isoforma CD23b e liberar fragmentos de CD23 solúvel (sCD23). Dugas et al. (1995) reportaram que o aumento da expressão de CD23 em monócitos ativados por IL-4 induz a produção de vários produtos pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$  e mediadores lipídicos. Em situações patológicas, a cascata de transdução de sinal via CD23 que leva ao aumento da produção de NO pode ser reforçada para proporcionar um mecanismo de defesa não específico potente. Esta via está diretamente envolvida na eliminação de *Leishmania* spp. por monócitos/macrófagos humanos, como demonstrado por Vouldoukis e colaboradores (1995). Após a indução da expressão do CD23 na superfície de monócitos/macrófagos humanos normais, a ligação específica de CD23 por IgE induz a ativação do gene que codifica iNOS levando à produção de NO, resultando em: (1) produção de mediadores pró-inflamatórios; (2) diferenciação de células, e (3) morte celular por apoptose (Paul-Eugène et al., 1994; Paul-Eugène et al., 1995).

Nesse contexto, nosso objetivo foi caracterizar o perfil de expressão do marcador de superfície CD23 e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4, envolvidos na indução de produção de óxido nítrico por monócitos do sangue periférico de indivíduos residentes na Terra indígena Xakriabá não infectados (NI), Teste de Montenegro positivo sem lesão (TM<sup>+</sup>) e portadores de leishmaniose cutânea localizada (LCL), considerando o

tempo de evolução da lesão.

Diferentes padrões de distribuição de linfócitos T nas lesões cutâneas ativas têm sido descritos:  $CD4^+ > CD8^+$  (Barral et al. 1987; Pirmez et al. 1990),  $CD4^+ = CD8^+$  (Lima et al. 1994) e  $CD4^+ < CD8^+$  (Vieira et al. 2002; Amato et al. 2003), sugerindo heterogeneidade dos subtipos de células T nas lesões. Acredita-se que estas células participem do reconhecimento antigênico e/ou da produção de citocinas no microambiente da lesão (Da-Cruz et al. 2005). Baratta-Masini et al. (2007), demonstraram que linfócitos T de pacientes portadores de LCL são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Segundo alguns autores, a secreção dessas citocinas está associada à ativação de macrófagos, produção de NO e consequente destruição de *Leishmania* (Titus et al. 1989, Liew et al. 1990, Barral-Netto et al. 1998). No entanto, não é a polarização da resposta imune o fenômeno mais importante para o controle e resolução da infecção, mas a modulação da resposta, onde observa-se aumento na expressão das citocinas do tipo 1, que irão ativar os macrófagos e matar os parasitos, modulada pela presença de IL-4 e IL-10, que regulam a resposta tipo 1, para que ela não se torne exacerbada e, conseqüentemente, associada à lesão tecidual extensa como descrito para os casos de leishmaniose mucosa (Cácers-Dittmar et al., 1993; Melby et al., 1994; Pirmez et al., 1993; Gaafar et al., 1999; Antonelli et al., 2004; Baratta-Masini et al., 2007).

Uma vez que a resposta imune na LCL vem sendo associada a um perfil modulado, com produção de citocinas inflamatórias, anti-inflamatórias e moduladoras, tem sido discutido por alguns autores os prováveis mecanismos associados ao estabelecimento da infecção e aparecimento de lesões cutâneas. Acredita-se que no início da infecção (lesão recente, LCL<60dias), os parasitos através de mecanismos de escape, modulem a resposta do tipo 1, criando um microambiente com predomínio das citocinas IL-4 e IL-10, favorecendo assim, o estabelecimento da infecção (Baratta-Masini et al., 2007). Ribeiro-de-Jesus et al. (1998), avaliando indivíduos infectados, com diferentes tempos de evolução da doença, sugeriram que alterações na resposta imunológica no início da infecção poderiam ser responsáveis pela multiplicação dos parasitos e desenvolvimento da infecção. Rocha et al. (1999), acrescentaram que haveria modulação da resposta Th1 durante a fase inicial da infecção por *L.(V.) braziliensis* e que, este fenômeno, ocorreria devido a presença de IL-10 no início da infecção, facilitando assim a multiplicação dos parasitos e o estabelecimento da infecção. Já o perfil de resposta imune tipo 1, com presença de citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ,



modulado por IL-4 e IL-10, seria marcante nos portadores de LCL com mais de 60 dias de evolução das lesões.

Ao avaliarmos as subpopulações de linfócitos T de indivíduos portadores de LCL residentes na Terra indígena Xakriabá, observamos que a estimulação com formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* promoveu uma queda no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 quando comparado ao grupo TM<sup>+</sup> (Figura 17). Ao separarmos o grupo LCL por tempo de evolução das lesões, observamos que tanto para os indivíduos portadores de lesão recente (LCL<60dias) quanto para os portadores de lesão tardia (LCL>60dias) essa redução no percentual de expressão dessas citocinas foi mantida (Figura 17). Esse resultado foi comprovado quando avaliamos o impacto da estimulação com *L. (V.) braziliensis*, através da análise do perfil panorâmico de biomarcadores (Figura 20), onde não houve diferenças entre o grupo LCL e o grupo referência NI. Ao contrário do que observamos, Baratta-Masini et al. (2007) demonstraram aumento da expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> no grupo LCL com lesões recentes (menos de 60 dias) e tardias (mais que 60 dias). Os autores sugerem que a ativação das células T CD4<sup>+</sup> é um processo mais precoce na leishmaniose humana, bem como a síntese de IFN- $\gamma$ .

Nenhuma diferença foi observada também ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figuras 17 e 18). No entanto, a frequência de alto produtores observada para a razão cultura estimulada / cultura controle, que nos permite avaliar o impacto da estimulação na assinatura de biomarcadores do grupo, mostrou maior frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> alto produtores de IL-4 e menor frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> alto produtores de IFN- $\gamma$  no grupo LCL em comparação à curva referência do grupo NI. Essas diferenças avaliadas por tempo de lesão mostraram estar associadas à lesão recente (Figura 26). Tem sido descrito aumento de IFN- $\gamma$  na população de células T CD8<sup>+</sup> apenas no grupo LCL>60dias, mostrando que as células associadas a cura e/ou resistência na LCL expressam IFN- $\gamma$  (Baratta-Masini et al., 2007). Apesar da baixa produção de citocinas por linfócitos T CD8 e ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados, sabemos que estas células têm um papel fundamental na resposta imune anti-*Leishmania*. Vários autores têm atribuído uma grande importância a esta população celular no controle da leishmaniose tanto no modelo murino quanto na infecção humana. Neste contexto, Da-Cruz et al. (1994); Coutinho et al. (1998); Da-Cruz et al. (2002) observaram um aumento no número de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas em PBMC de indivíduos

curados, quando comparados a indivíduos com LCL ativa. Os autores sugerem que as células T CD8<sup>+</sup> possam estar associadas ao processo de cura na LCL. Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas no perfil de citocinas intracitoplasmáticas na população T CD8<sup>+</sup>, quando comparamos os grupos avaliados. Entretanto, Baratta-Masini et al. (2007) observaram que as células T CD8<sup>+</sup> respondem *in vitro* aos antígenos solúveis do parasito, aumentando a síntese das citocinas do tipo 1 como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e também de IL-10 que apresenta atividade reguladora importante. Diante disso, é interessante observar que, nos indivíduos infectados, estas células respondem *in vitro* ao antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL), aumentando a expressão de algumas citocinas. Em geral, acredita-se que antígenos exógenos e solúveis induzem uma resposta específica da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que está restrita principalmente ao MHC de classe II. No entanto, dados recentes têm demonstrado que células apresentadoras de antígenos (APCs) podem adquirir antígenos exógenos, por meio de fagocitose e apresentá-los aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no contexto de moléculas MHC de classe I (Rock., 1991; Grant & Rock., 1992; Rock., 1993). Assim, sugerimos que a baixa produção de citocinas intracelulares e a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos avaliados na subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem ter ocorrido devido à estratégia de estimulação utilizada, no caso, promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis*.

Assim como em outros trabalhos publicados, observamos um aumento no percentual de monócitos expressando CD23 no grupo LCL em relação aos grupos TM+ e NI (Baratta-Masini et al., 2007; Cabrera et al., 2003; Vouldoukis et al., 1995; Freitas-Teixeira et al., 2012). Esse aumento se mantém quando dividimos o grupo LCL por tempo de lesão, havendo diferença estatisticamente significativa no grupo LCL>60 em relação ao LCL<60. É sabido que a síntese de IgE e a expressão de CD23 estão aumentadas na LCL (Mossalayi et al., 1999). Os resultados do teste sorológico realizado para quantificação de IgE no soro dos indivíduos participantes do estudo nos levou a uma série de questionamentos a respeito da estratégia utilizada (Figura 21). Diante dos resultados obtidos na sorologia, constatou-se uma concentração de IgE significativamente maior no grupo controle, em relação aos demais, sendo que o grupo LCL apresentou os menores níveis dessa molécula, o que não era esperado por nosso grupo diante alguns trabalhos publicados (Cabrera et al., 2003; Lynch et al., 1982; O'Neil et al., 1993; Vouldoukis et al., 1994; Sousa-Atta et al., 2002) e diante dos altos níveis de expressão de CD23 por monócitos nesse grupo em comparação aos demais. A

nossa hipótese para este achado é que os indivíduos que compõe o grupo dos não infectados produziram maior quantidade de IgE devido à doenças de origem alérgica ou helmíntica, caracterizadas pela alta expressão dessa imunoglobulina. Assim, para a obtenção de resultados confiáveis seria necessário a busca por IgE específica para *Leishmania*, que nos daria a garantia de que a produção deste anticorpo estaria realmente relacionada à LCL.

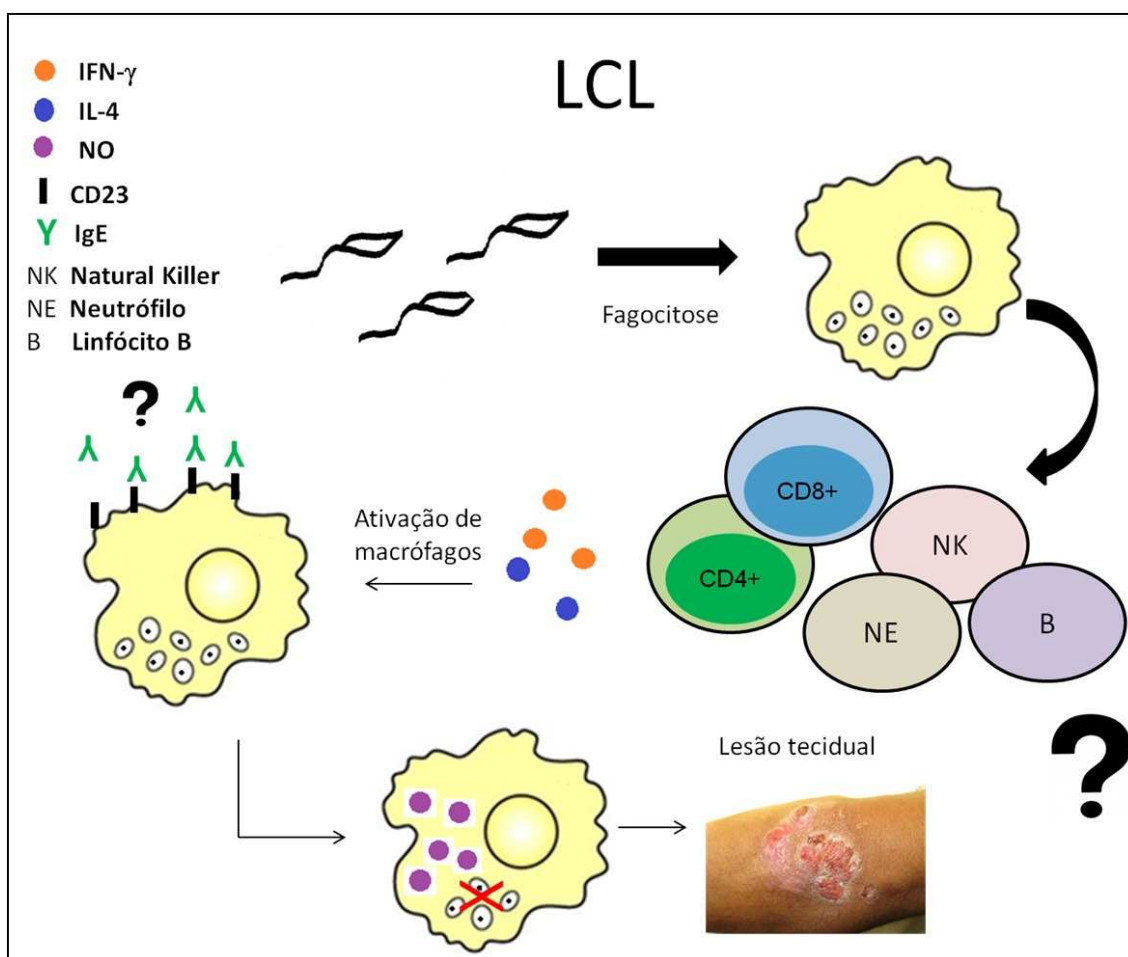
Diante dos dados obtidos nesse estudo para o grupo LCL, parece haver uma deficiência na produção de citocinas por linfócitos T, importantes no contexto da doença. No entanto, não podemos deixar de mencionar que outras fontes celulares de produção dessas citocinas, como neutrófilos, monócitos e células NK, não foram avaliadas e estão diretamente envolvidas no direcionamento do perfil imunológico associado à LCL, tanto para a LCL<60dias quanto para a LCL>60dias. O aumento na expressão de CD23 por monócitos dos indivíduos do grupo LCL, tanto na cultura estimulada quanto na cultura controle em relação aos demais grupos, reforça a idéia de que outras populações celulares estariam envolvidas na produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , responsável por induzir a ativação de macrófagos. Essas células passariam então a expressar maiores níveis de CD23 em sua superfície, que ao se ligar a moléculas de IgE, levariam ao aumento na produção de NO. Nossos dados mostraram elevado percentual de monócitos produtores de NO no grupo LCL tanto para os casos de lesão recente quanto tardia (Figura 19), onde o maior percentual de alto produtores foi observado no grupo LCL<60dias (Figura 20). Nossos dados corroboram com os achados de Baratta-Masini et al. (2007) sugerindo que o perfil pró-inflamatório é um evento precoce na LCL.

Assim, sugerimos que um predomínio das citocinas do tipo 2 em indivíduos do grupo LCL<60dias, seja um fenômeno transitório uma vez que pacientes com menos de 60 dias de evolução da lesão apresentam aumento da expressão de CD23 e produção de NO, biomarcadores associados à destruição das leishmanias intracelulares, visto também por Freitas-Teixeira et al. (2012). Além disso, sugerimos que outras fontes celulares não avaliadas nesse estudo estariam envolvidas no estabelecimento de um microambiente pró-inflamatório importante para a ativação dos macrófagos e controle da doença, como por exemplo células NK, neutrófilos e linfócitos B (Freitas-Teixeira et al., 2012; Baratta-Masini et al. 2007) (Figura 20).

Diante dos dados apresentados, não podemos deixar de chamar atenção para as particularidades intrínsecas à nossa área de estudo. Outros estudos realizados na Terra

Indígena Xakriabá por nosso grupo relatam uma prevalência de 70% de lesões atípicas (Freire, 2011). Sabe-se que diferentes manifestações clínicas dependem, dentre outros fatores, do status imunológico do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* envolvida. Curiosamente, em estudo de Quaresma (2011) foi relatada a presença de um perfil de *L. (V.) braziliensis* geneticamente diferente da cepa referência para essa espécie, havendo correlação positiva entre a infecção causada por esse parasito e presença de lesão atípica. Além disso, devemos ressaltar que nossa população de estudo é indígena, diferente de qualquer outra população avaliada em estudo de resposta imune na Leishmaniose Cutânea.

Assim, diante dos resultados obtidos no presente trabalho, propusemos um modelo de como ocorreria a ativação de macrófagos e produção de NO no grupo LCL, (Figura 23):

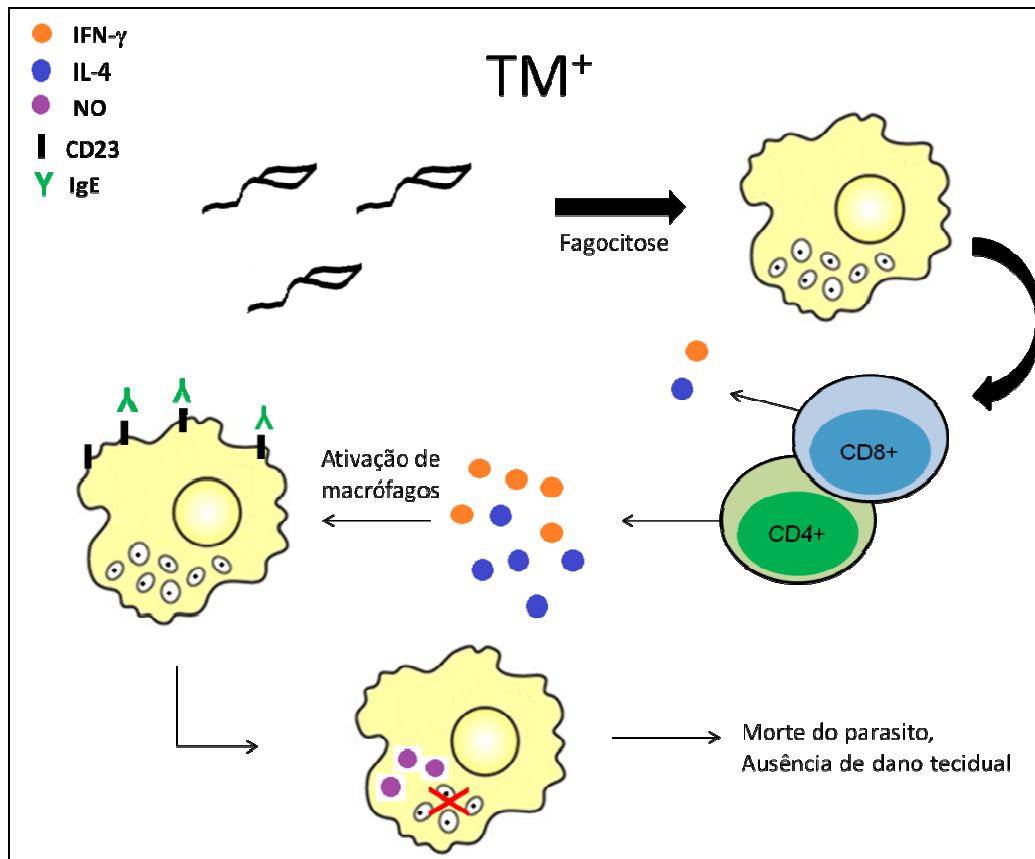


**Figura 23:** Desenho esquemático ilustrando a participação do mecanismo de ativação de monócitos e produção de NO via IFN- $\gamma$ , IL-4 e CD23 no estabelecimento e desenvolvimento da forma clínica cutânea localizada.

Embora vários trabalhos tenham avaliado o perfil imunológico associado à LCL, os eventos imunológicos associados à resistência natural, ainda não são bem conhecidos. Acredita-se que indivíduos naturalmente resistentes, seriam aqueles que entraram em contato com o parasito e controlaram a infecção sem ficar doentes. Esse grupo, denominado  $TM^+$  foi primeiramente descrito por Mayrink e colaboradores (1979), em estudos realizados em Caratinga-MG, onde detectaram um grupo de indivíduos, com intradermo reação de Montenegro (IDRM) positiva na primeira vez em que foi realizada e sem história clínica e de tratamento compatível com a LCL.

Ao avaliarmos as subpopulações de linfócitos T de indivíduos residentes na Terra indígena Xakriabá resistentes ( $TM^+$ ) observamos que a população de linfócitos T  $CD4^+$  parece contribuir como a principal fonte das citocinas  $IFN-\gamma$  e IL-4. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Adjary et al. (2000) e Botterel et al. (2001). Foi possível observar no grupo  $TM^+$  aumento significativo na expressão de  $IFN-\gamma$  e IL-4 pelas células T  $CD4^+$  após a internalização de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e também quando comparado aos outros grupos avaliados. Além disso, nossos resultados demonstraram que monócitos dos indivíduos do grupo  $TM^+$  apresentam aumento significativo da expressão de CD23 e produção de NO após a internalização de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

As análises complementares de avaliação do perfil panorâmico de biomarcadores e de correlações reforçam esses achados. Observamos que no grupo  $TM^+$  há possibilidade da participação deste mecanismo de ativação de monócitos e indução de NO investigado no estudo. Os dados de avaliação da razão (cultura estimulada / cultura controle) da frequência de alto produtores demonstraram frequência relevante de alto produtores de  $IFN-\gamma$ , IL-4 e NO e frequência relevante de expressão de CD23 no grupo  $TM^+$  quando comparado à curva ascendente de biomarcadores do grupo controle. Já as análises de correlação mostraram correlação positiva entre a expressão de CD23 e produção de NO por monócitos e correlação positiva entre  $IFN-\gamma$  e IL-4. Os achados desse estudo corroboram os resultados encontrados no estudo de Baratta-Masini et al., 2007 em Caratinga-MG, com população não indígena e sugerem que o aumento na produção de  $IFN-\gamma$  e IL-4 por linfócitos T  $CD4^+$  e o aumento da expressão de CD23 por monócitos levam à ativação dessas células, aumentando a produção de NO e, conseqüentemente, favorecendo o controle da infecção, impedindo assim, o aparecimento de lesões (Figura 24).



**Figura 24:** Desenho esquemático ilustrando a participação do mecanismo de ativação de monócitos e produção de NO via IFN- $\gamma$ , IL-4 e CD23 no controle e resistência à infecção por *L. (V.) braziliensis*.

É relevante comentar também sobre o perfil imunológico observado para o grupo NI. Esse grupo foi composto por 10 indivíduos não infectados, residentes na Terra indígena Xakriabá, apresentando todos os resultados dos métodos diagnósticos (incluindo o TM<sup>+</sup>) negativos para LCL e sem história pregressa de LCL. Os dados demonstraram que após estimulação com antígeno solúvel de *L. (V.) braziliensis* houve aumento no percentual de monócitos produtores de NO e que embora não tenhamos observado impacto da internalização de formas promastigotas vivas de *L. (V.) braziliensis* no perfil de expressão de CD23 e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4, houve correlação positiva entre a expressão de CD23 e produção de NO, bem como entre IFN- $\gamma$  e IL-4. Esses dados sugerem que indivíduos não infectados, residentes em área endêmica podem apresentar resposta imunológica direcionada ao controle da infecção, caso sejam expostos ao parasito.

*Perfil de resistência / susceptibilidade ao NO de isolados de Leishmania (V.) braziliensis*

Após avaliar o perfil imunológico, especialmente o papel do NO no controle da infecção e aparecimento das lesões, associado à infecção por *L. (V.) braziliensis* na população residente na Terra indígena Xakriabá, foi de nosso interesse, conhecer o perfil de resistência / susceptibilidade de isolados de *L. (V.) braziliensis* ao NO. Para isso, foram selecionados isolados de cultura de biópsia ou aspirado de lesão de 10 portadores de LCL da Terra Indígena Xakriabá, e classificados de acordo com a resposta ao tratamento com Glucantime®. Dos 10 isolados selecionados, 5 eram provenientes de indivíduos responsivos, ou seja, curados durante o primeiro ciclo de tratamento e os outros 5 de pacientes refratários, que necessitaram de mais de um ciclo de tratamento ou apresentaram recidiva.

Para a realização dos ensaios de viabilidade, foi utilizado o método do MTT. Como doador de NO utilizamos o Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) que em meio ácido libera NO induzindo a atividade leishmanicida deste radical livre, simulando o que ocorre no ambiente intracelular (Mauel et al., 1991).

Como demonstrado em outros trabalhos (Giudice et al., 2007; Souza et al., 2010), nesse estudo, isolados provenientes de pacientes refratários ao tratamento, apresentaram-se mais resistentes à ação do NO, havendo diferença estatisticamente significativa na maior concentração de  $\text{NaNO}_2$  (512 mM) (Figura 29). Holzmuller et al. (2005), utilizando isolados resistentes ao antimonial trivalente (SbIII), demonstraram que este parasito foi resistente à um doador exógeno de NO. O tratamento com Stibogluconato de Sódio ou qualquer outra apresentação do antimonial pentavalente, induz a produção de radicais de nitrogênio e oxigênio, principalmente o NO, em macrófagos infectados por *L. donovani* (Mookerjee et al., 2006), reforçando a relação entre isolados resistentes e a não responsividade ao tratamento. Os resultados da análise geral do comportamento dos isolados de *L. (V.) braziliensis* frente a exposição à diferentes concentrações de  $\text{NaNO}_2$ , indicam que a resistência ao NO pode estar relacionada à falha na terapia com Glucantime®.

No entanto, nos experimentos realizados para determinar a concentração de  $\text{NaNO}_2$  necessária para produzir 50% de redução da viabilidade celular, nossos resultados não apresentaram perfil dose-dependente. Assim, não foi possível a determinação da IC50 para nenhum dos 10 isolados, considerando as concentrações de

NaNO<sub>2</sub> utilizadas em nosso estudo. As curvas, quando obtidas, não apresentaram perfil sigmóide característico para definição segura da IC50, inviabilizando a apresentação deste tipo de análise. Diante desses resultados, optamos pela determinação do percentual de inibição da viabilidade, calculado para cada uma das amostras, na tentativa de estabelecer a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para inibição de 50% da viabilidade celular. Os resultados demonstraram que apenas para os isolados dos pacientes 426 e 387, responsivos ao tratamento com Glucantime®, foi possível estabelecer a concentração de NaNO<sub>2</sub> necessária para inibir 50% da viabilidade celular. Os resultados individuais sugerem não haver uma relação direta entre boa resposta ao tratamento e susceptibilidade ao NO nos isolados avaliados. Esta observação sugere que os parasitos devem apresentar variações genotípicas que, traduzidas, resultam em diferenças em seu fenótipo. Um estudo de variabilidade genética de isolados de *L. (V.) braziliensis* da Terra Xakriabá realizado por nosso grupo apontou a existência de dois perfis circulantes de *L. (V.) braziliensis* entre os pacientes com LTA.

De fato, Tibayrenc (1998) acredita que exista grande diversidade genética em muitas espécies de parasitos, sendo esta a principal estratégia evolutiva de adaptação dos parasitos às variações ambientais e que, provavelmente, esta variabilidade genética tenha impacto nas características biológicas destes parasitos (Gontijo, 2000). Outros trabalhos apontam ainda a existência de variações antigênicas intraespecíficas que influenciam na distribuição e evolução de caracteres relacionados com a virulência, infectibilidade e patogenicidade (Cupolillo et al., 1995; Saravia et al., 1998). Além disso, é importante ressaltar, dentre outros fatores, que as culturas utilizadas nos testes de viabilidade, não foram recém isoladas. O projeto Xakriabá teve início no ano de 2008, onde começaram a ser feitas as biópsias e aspirados para diagnosticar os primeiros casos da doença na área. Desde então, foi criado um banco de isolados dos participantes do estudo. O número de passagens, o uso de antibióticos e até mesmo o meio de cultura utilizado podem influenciar fenotipicamente os isolados, levando assim ao aparecimento de resultados não esperados.

Nesse contexto, embora os estudos de resistência / susceptibilidade ao NO tenham se mostrado promissores na busca por respostas relacionadas ao curso da infecção, evolução do tratamento e variabilidade genética intraespecífica de *Leishmania*, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas, no sentido de identificar os mecanismos genéticos/moleculares que levariam à existência de cepas resistentes e



susceptíveis ao NO. Dessa forma, novos estudos devem ser realizados, com o objetivo de esclarecer estes mecanismos, para que outras medidas terapêuticas possam ser avaliadas para o tratamento de portadores de leishmaniose refratários ao uso de antimoniais pentavalentes.

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

Os portadores de leishmaniose cutânea localizada da Terra indígena Xakriabá, demonstraram deficiência na produção das citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  por linfócitos T, sugerindo que outras fontes celulares possam estar envolvidas nessa produção.

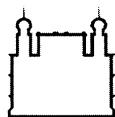
No grupo LCL parece haver outra via de ativação da produção NO, diferente da investigada neste estudo.

Pacientes com tempo de lesão menor que 60 dias apresentam um predomínio transitório de citocinas do tipo 2, favorecendo o estabelecimento da infecção e um aumento na expressão de biomarcadores associados à destruição das leishmanias intracelulares.

No grupo TM<sup>+</sup> sem lesão há fortes indícios da participação do mecanismo de ativação de monócitos e indução de NO investigados neste estudo, favorecendo o controle da infecção e impedindo o aparecimento de lesões.

Isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes refratários ao tratamento, apresentaram-se mais resistentes à ação do NO, indicando que essa resistência pode estar relacionada à falha na terapia com Glucantime®.

## 8 ANEXOS



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
Comitê de Ética

### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA SUBMETIDO AO CEPESH/CPqRR

Protocolo CEPESH/CPqRR nº: 021/2007

**Projeto de Pesquisa:** "Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil"

**Pesquisador Responsável:** Célia Maria Ferreira Gontijo

**Instituição:** Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

**Data de entrada no CEP:** 4/12/2007

#### **Parecer:**

O trabalho tem por objetivo estudar aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos transmissores e possíveis reservatórios na reserva indígena Xacriabá em Minas Gerais.

**Avaliação:** O projeto apresenta alta relevância tendo em vista a prevalência e dificuldade de controle da leishmaniose nas comunidades indígenas em função das condições de vida das mesmas em íntimo contato com transmissores e reservatórios da doença. Conhecendo a prevalência e distribuição da doença e demais agentes envolvidos no ciclo de transmissão teremos novos dados para planejamento do combate à mesma. Além disto está garantida propeidética adequada e tratamento a todos os casos detectados. Embora haja sempre questionamentos em relação a pesquisas envolvendo povos indígenas, neste caso a pesquisa tem objetivos claros de benefício de outros povos indígenas com o resultado, pois as conclusões serão facilmente aplicáveis a populações semelhantes, e além disto o material coletado será utilizado exclusivamente na pesquisa atual. Os termos de consentimento são claros e as devidas licenças junto à FUNAI e FUNASA serão providenciadas.

O projeto possui garantia de financiamento através da FIOCRUZ. Os pesquisadores envolvidos apresentam vasto currículo e ampla experiência na área.

**Conclusão:** Tendo em vista o projeto cumprir todos os preceitos legais sugerimos a aprovação do mesmo por esse comitê.

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2007.

João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do CEPESH-CPqRR

*Dr. João Carlos Pinto Dias*  
COORDENADOR  
COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA  
FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO



AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA

Nº: 149/ICGEP/08

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Célia Maria Ferreira Gontijo Processo: nº.2098/08

Nacionalidade: brasileira Identidade: RG nº.M-663908 SSP MG

Instituição/Entidade: Laboratório de Leishmanioses – Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ

Patrocinador:

OBJETIVO DO INGRESSO

Desenvolver o projeto de pesquisa científica intitulada “Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil”.

EQUIPE DE TRABALHO

Nome	Nacionalidade	Identidade
Elizabeth Castro Moreno	brasileira	RG 867963 SSP MG
Patrícia Flávia Quaresma	brasileira	RG 11616996 SSP MG
Filipe Augusto Maximiano Madeira	brasileiro	RG 11030749 SSP MG
Heitor Moraes Cunha	brasileiro	CRBio 44441/04-D MG
Lutiana Amaral de Melo	brasileira	RG 9117142 SSP MG
Edelberto Santos Dias	brasileiro	CRBio 13446/4-D MG
Ricardo Andrade Barata	brasileiro	CRBio 160154 MG
Adriano Pereira Paglia	brasileiro	RG 2099566 SSP MG

Terra Indígena: Xakriabá

Etnia: Xakriabá

Administração Regional: Governador Valadares

Posto Indígena: Xakriabá

VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO

Início: 12 de outubro de 2008

Término: 12 de outubro de 2009

OBSERVAÇÕES

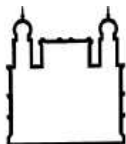
\* Remeter à Funai/Coordenação Geral de Estudos e Pesquisas - CGEP, duas cópias da monografia, relatórios, artigos, livros, gravações, imagens e outras produções oriundas do trabalho realizado.

\* Esta autorização não inclui cessão de uso de imagem e som de voz dos índios, nem acesso a conhecimentos tradicionais associados a biodiversidade.

Autorizo:

Brasília, 17 de setembro de 2008.

Marco Augusto Paiva de Almeida  
Presidente da Funai



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

---

**ESTUDO: Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil.**

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

ID: \_\_\_\_\_

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO VOLUNTÁRIO**

Esta pesquisa tem como objetivo estudar aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos possíveis reservatórios silvestres (roedores, gambás) e domésticos (cães) e aos insetos vetores na reserva indígena Xacriabá, utilizando exame físico e de sangue e será desenvolvido sob a responsabilidade da Pesquisadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo.

A minha participação será restrita a uma entrevista individual e uma entrevista domiciliar, à realização de teste intradérmico para diagnosticar leishmaniose tegumentar, à doação de sangue para realização de testes de diagnóstico e, quando houver lesão característica, poderá ser realizada a retirada de um pequeno fragmento para isolamento do agente causador da doença. Na entrevista serão feitas perguntas com o objetivo de avaliar os fatores de risco para doença. Além disso, dou permissão para coleta de amostras biológicas de animais domésticos e de pequenos animais silvestres próximos da minha residência.

Tenho conhecimento de que caso meu animal doméstico (cão) apresente resultado positivo nos exames sorológicos ele será recolhido e eutanasiado conforme as instruções do Manual de Controle da Leishmaniose do Ministério da Saúde.

Tenho conhecimento de que caso seja submetido ao tratamento para a leishmaniose tegumentar serão feitas fotografias para documentação da evolução do tratamento. Tenho conhecimento de que as fotografias retiradas preservarão minha identidade.

Tenho conhecimento de que as informações fornecidas nas entrevistas e também os resultados dos testes realizados a partir das amostras de sangue e pele de lesão cedidas por mim serão CONFIDENCIAIS e utilizados somente para esta pesquisa. Meu nome, endereço ou qualquer informação que possa me identificar não aparecerão, de nenhum modo, em qualquer apresentação pública.

Tenho consciência que a minha participação como voluntário não me trará nenhum benefício ou privilégio e em hipótese alguma prejudicarão a minha saúde e bem-estar. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos e receberei atenção médica adequada em todos os momentos da pesquisa.

Poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isso acarrete prejuízo para mim ou minha família.

Poderei no momento em que desejar procurar a coordenadora da pesquisa para esclarecer qualquer questão ou o médico responsável pelo projeto.

Coordenadora da pesquisa: **Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo**

Endereço: Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima nº 1715, Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, MG.

Telefone: (31) 3349 7755.

Médicos responsáveis:

Dr. Joaquim Edemilson Diniz. CRM: 37630

Endereço: Rua Januária 530, Bairro JK, Manga, MG.

Telefone: (38) 3615 1585.

Dra. Janaina de Moura Freire. CRM: 28158

Endereço: Rua Marechal Jofre 231, apto 406, Bairro Grajaú, Belo Horizonte, MG

Telefone: (31) 3327 2412

Eu li este consentimento e me foram dadas oportunidades para esclarecer minhas dúvidas. Minha participação é inteiramente voluntária, portanto, concordo em participar e assino abaixo em duas vias.

Local \_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## 9 REFERÊNCIAS

- Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*. 2000; 68 (4):1760–4.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 341-348.
- Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *The FASEB Journal*. 1993; 7(2): 349-60.
- Arturo A, Wilkins-Rodriguez AA, Escalona-Montaña AR, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania Mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol*. 2010; 126: 426-34.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol*. 2009; 121: 317-22.
- Baratta-Masini A, Teixeira-Carvalho A, Malaquias LC, Mayrink W, Martins Filho O A, Oliveira RC. Mixed cytokine immunity revealed early type-2 and late type-1 profiles during active cutaneous leishmaniasis and predominance of type-1 pattern in naturally resistant individuals. *Front Biosci*. 2007; 12; 839-49.
- Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Netto M, Costa JM, Badaro R, Rocha H, Jonhson JD. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987; 9: 487-497.
- Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho EM, Barral A. Human\_leishmaniasis/cytokines.bahia.br. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31: 149-55.
- Barreto RL, Correia CRD, Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*. 2005; 28: 1046-54.
- Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol*. 2004; 7(3): 328-37.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Inf. Dis*. 1988; 10: 560-86.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A: The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*. 2000; 173:17-26.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996 Nov;84(2):188-94.

Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA *et al*. 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* 2001; 69:3232-9.

Cabrera MA, Paula AA, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, Silva AV, Jansen, AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 2003; v.25, n.2, p.79-83.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 273-7.

Carvalho LP, Passos ST *et al*. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia*. 2005. 1 (75): 57-65.

Clementino AM, Monte-Mor RL. Xakriabás - economia, espaço e formação de identidade. Trabalho apresentado ao XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais, ABEP. Caxambu, Minas Gerais, Setembro de 2006.

Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993 Jul-Aug;87(4):444-8

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM *et al*. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*. 1996; 84: 144-55.

Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1998; 31: 139-142.

Cunha FQ, Weiser WY, David JR, Moss DW, Moncada S, Liew FY. Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages. *J Immunol*. 1993; 150: 1908-12.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73: 145-155.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994; 62: 2614-8.



Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 251–6.

De Carneri I, Nuttels N, Miranda JA. Epidemic of Cutaneous Leishmaniasis among the Waur'a Indians of the Xingu National Park (State of Mato Grosso, Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1963; 10: 271-2.

Daff S. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*. 2010; 23: 1-11.

Delespesse G, Suter U, Mossalayi D, Bettler B, Sarfati M, Hofstetter H, Kilcherr E, Debre P, Dalloul A. Expression, Structure, and Function of the CD23 Antigen. *Adv Immunol*. 1991; 49: 149-91.

Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1997; 185(12): 2061-8.

Diniz SC, Magalhães FNC, Monte-Mór RLM. Economia e Etnodesenvolvimento no território indígena Xakriabá, MG, 2006.

Drapier JC, Weitzerbin J, Hibbs JB. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages *Eur J Immunol*. 1988; 18: 1587-90.

Dugas B, Mossalayi MD, Damais C, Kolb JP. Nitric oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23. *Immunol Today*. 1995; 16(12): 574-80.

Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 1997; 99(12): 2818-25.

Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: E54-8.

Forattini OP, Dos Santos M. Note on a focus of American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1956; 8: 127-33.

Freitas-Teixeira PM, Silveira-Lemos D, Giunchetti RC, Baratta-Masini A, Mayrink W, Peruhype-Magalhães V, Rocha RDR, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Distinct Pattern of Immunophenotypic Features of Innate and Adaptive Immunity as a Putative Signature of Clinical and Laboratorial Status of Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2012; 76: 421-432.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Quantitativo de pessoas. Disponível em: [http://sis.funasa.gov.br/transparencia\\_publica/siasiweb/Layout/quantitativo\\_de\\_pessoas\\_2010.asp](http://sis.funasa.gov.br/transparencia_publica/siasiweb/Layout/quantitativo_de_pessoas_2010.asp). Acesso em: 26/09/2010 as 17:35.

- Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, El Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. Clin Immunol 1999; 91: 314-320.
- Gantt KR, Goldman T., McCormick M., Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. Journal of Immunology 2001; 167 (2) , pp. 893-901.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. BMC Infect Dis. 2007; 7: 7-18.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8: 419-33.
- Gontijo, CMF. Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: estudos Moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 2000. 140. (Tese Doutorado).
- Gordon J. B-cell signalling via the C-type lectins CD23 and CD72. Immunol Today. 1994; 15(9): 411-17.
- Gorren ACF, Mayer B. Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2007; 1770(3): 432-45.
- Green PJ, Feizi T, et al. "Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein." Mol Biochem Parasitol. 1994; 66(2): 319-28.
- Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; 103: 712-5.
- Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J Physiol Pharmacol. 2003; 54: 469-87.
- Havenga MJ, Van Dam B, Groot BS, Grimbergen JM, Valerio D, Bout A, Quax PH. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. Anal Biochem. 2001; 290: 283-91.
- Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg. 1992; 46: 296-306.
- Horta MF, Mendes MP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira LS, Duarte MM, Vieira LQ. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. Journal of Parasitology Research. 2012; 2012: 1-11.

- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I et al. Arginase I induction in macrophages triggered by Th2-type cytokines supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 2002; 24: 113-8.
- James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev.* 1995; 59(4): 533-47.
- Kemp M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl* 1997; 68:1-33.
- Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100(5): 567-75.
- Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: A brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1, 13-32.
- Lampiao F, Strijdom H, Du Pressis SS. Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Int J Androl.* 2006; 29(5): 564-7.
- Lescure FX, Bonnard P, Chandenier J, Schmit JL, Douadi Y. Atypical cutaneous leishmaniasis. *Presse Med.* 2002; 31(6): 259-61.
- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990; 145: 4306-10.
- Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 743-747.
- Lindoso JAL, Lindoso AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2009; 51(5): 247-53.
- Lowry OH, Rosebrough NR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
- Machado P, Araujo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: E69-73.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80(6): 8859-976.
- Mauel J, Ransijn A, Buchmüller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J Leukoc Biol.* 1991; Jan; 49(1):73-82.
- Melby PC, Andrade-Narvaez F, Darnell BJ. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis *Infection and Immunity* 1994; 62, 837-842.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. 1ª ed., Brasília. 136p.

Ministério da Saúde, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, segunda edição. Brasília-DF, 2007.

Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri SK, Saha B, Raha S, Roy S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50:1788–1797.

Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I. The Human Immune Response during Cutaneous Leishmaniasis: NO Problem. *Parasitology Today*. 1999; 15(8): 342-345.

Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*. 1985; 135: 2785-9.

Mosser DM, Edelson PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 1987; 327 :329-31.

Mosser DM, Handman E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind *leishmania* promastigotes. *J. Leukoc. Biol* 1992; 52,369-376

Mosser DM, Springer TA, Diamond MS. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1992; 116: 511-20.

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

Morris, S. M.; Billiar, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 1994; 266: 829-39.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*. 1992; 6(12): 3061-4.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78 (6), pp. 915-918.

Oliveira MC, Amorim RF, Freitas Rde A, Costa Ade L. A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38: 258-60.

O`Neil CE, Labrada M, Saravia NG. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 181-188.

Ouellette MJD. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Update*. 2004; 7: 257-66.

Paul-Eugène N, Kolb JP, Damais C, Dugas B. Heterogeneous nitrite production by IL-4-stimulated human monocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Letts* 1994; **42**, 31–34.

Paul-Eugène N, Mossalayi D, Sarfati M, Yamaoka K, Aubry J, Bonnefoy J, Dugas B, Kolb J. Evidence for a Role of Fc $\gamma$ RII/CD23 in the IL-4-Induced Nitric Oxide Production by Normal Human Mononuclear Phagocytes. *Cell Immunol*. 1995; 163(2): 314-8.

Pena JL. Perfil sanitário, indicadores demográficos e saúde ambiental após a implantação do distrito sanitário especial indígena: o caso dos Xacriabá em Minas Gerais. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG - Belo Horizonte, 2004.

Pena JL, Heller L. Environmental sanitation and indian health: an assessment on the Xacriabá population, Minas Gerais. *Eng Sanit Ambient*. 2008; 13: 63-72.

Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 1990; 145: 3100-3104.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993; 91: 1390-5.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011; 105: 579-85.

Rathel TR, Leikert JJ, Vollmar AM, Dirsch VM. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells *in vitro*. *Biol Proced Online* 2003; 5: 136–142.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31: 143-8.

Rathel TR, Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells *in vitro*. *Biol Proced Online*. 2003; 5: 136-42.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13:151–77.

Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem*. 2004; 279: 23668-78.

Rocha RD, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para a identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(6): 551-62.

Rocha RD, Gontijo CMF, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Ferrari TC, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-live *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2006; 11(2): 156-66.

Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrl ME, Mosser DM. *Leishmania* major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. Infect Immun. 1996; 64: 2206-15.

Sadigursky M, Brodskyn CI. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35: 942-4.

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

Santoro G, Romeo C, Impellizzeri P, et al. Nitric oxide synthase patterns in normal and varicocele testis in adolescents. BJU Int. 2001; 88: 967-73.

Schachnik NC, Peruhype-Magalhães V, Paula GM, et al. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. J Immunol Methods. 2009; 343: 103-11.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J Exp Med. 1988; 168: 1675-84.

Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 374-89.

Shimabukuro PHF, Silva TRS, Fonseca, FOR, Baton LA, Galati EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. Parasites & Vectors, 2010; 3: 121-32.

Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory markers and a history of trauma. Ann Int Med. 1984; 101: 847-51.

Sousa-Atta MLB, Salamé GS, D'Oliveira Júnior A, et al. Immunoglobulin E Antileishmanial Antibody Response in Cutaneous Leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol. 2002; 9(1): 101-4.

Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML. Guidelines for the Use of Iron Supplements to Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia. International Nutritional Anemia Consultative Group, Washington. 1998; 46p.

- Strianese M, Martino F, Pavone V, Lombardi A, Canters GW, Pellicchia C. A FRET-based biosensor for NO detection. *J Inorg Biochem.* 2010; 104: 619-24.
- Strijdom H, Muller C, Lochner A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37: 897-902.
- Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Eur J Trop Med Int Health.* 2002; 6(11): 849-854.
- Theodos CM, Titus RG. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol.* 2007; 15(8): 481-7
- Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 1998; 28: 85-104.
- Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science.* 1988; 239(4845): 1306-8.
- Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1989; 170: 2097-104.
- Tsikis, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B.* 2007; 851: 51-70.
- Uchida K, Mishima S, Ohta S, Yukioka T. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Ameliorates Lung Injury in Rats After Gut Ischemia-Reperfusion. *J Trauma.* 2007; 63(3): 603-7.
- Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Netto M, Barral A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 979-983.
- Von Stebut, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol.* 2007; 17(2): 115-22.
- Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 7804-8.
- Vouldoukis I, Issaly F, Fourcade C, Paul-Eugene N, Arock M, Kolb JP, Da Silva OA, Mossalayi MD. CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: Possible role in monocyte activation. *Research in Immunology* 1994; 145 (1), pp. 17-27.