

MARTHINA GOMES DE MIRANDA

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E
NITROGÊNIO E ÍNDICE DE INFECÇÃO POR MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SUSCETÍVEIS OU
RESISTENTES À LEISHMANIOSE INFECTADOS *IN VITRO*
COM *Leishmania amazonensis*.

BRASÍLIA, 2012.

MARTHINA GOMES DE MIRANDA

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO E ÍNDICE
DE INFECÇÃO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS
SUSCETÍVEIS OU RESISTENTES À LEISHMANIOSE INFECTADOS *IN VITRO*
COM *Leishmania amazonensis*.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

BRASÍLIA, DF

2012

Dedicatória

A Deus, fonte de luz e força em minha vida, aos meus pais, Melquizedeque e Zélia pelos bons exemplos de determinação, superação, força e fé.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que está sempre presente me dando força, a Jesus e Maria que me acompanham e me ajudam em todos os desafios que aparecem em minha vida. A minha mãe, Zélia Maria Gomes, por todo amor, carinho e dedicação dispensados a mim e pelo exemplo de mulher. Ao meu pai Melquizedeque Machado de Miranda, por sempre me conduzir aos bons caminhos dos estudos e por todos os ensinamentos de vida. Obrigada por todos os sacrifícios e privações que passaram e passam para que eu alcance os meus objetivos. Meus orgulhos, eu dedico a vocês essa minha vitória. Eu amo vocês.

Ao meu noivo, Leandro Oliveira Silva, por todo amor, carinho, compreensão, companheirismo e ajuda, principalmente, durante esse período. Com certeza, sem o seu auxílio não teria conseguido. Obrigada, meu amor, por fazer parte da minha história. Te amo.

As meus irmãos, Rita de Cássia, Rosângela e Marcelo, aos meus tios Valdecir e Marina por todas as palavras de apoio e motivação.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pelos momentos de aprendizados doados com tanto amor. Pelas horas de folgas dedicadas a favor da continuidade e término desse trabalho. Um exemplo de professora sempre dedicada e um exemplo de pessoa a ser seguido. Muito obrigada pela oportunidade.

A Érica Alessandra Rocha Alves, companheira de experimentos que se tornou uma amiga. Muito obrigada por toda colaboração dada a este trabalho, pelos momentos de companhia, pelo exemplo de vida pessoal e profissional. Sem a sua ajuda, tudo se tornaria muito mais difícil. Agradeço também ao seu marido e sua filha, Otávio e Ana Beatriz, pela compreensão e companhia ao longo dos experimentos.

A Viviane Medeiros Silva, uma amiga, irmã. Obrigada por todos os momentos compartilhados, por toda ajuda e por todas as palavras amigas de incentivo que são muito importantes em minha vida. Agradeço a Deus por ter sua amizade.

As minhas amigas, Andrea Costa, Alline Cabral, Fernanda Batista, Joyce Moraes, Juliana Nogueira, Tarcila Landim e ao Alberto Nery, pela amizade, companheirismo e incentivo.

A Shirley Couto, pela paciência, auxílio nos experimentos, amizade, conselhos e palavras de motivação. Obrigada por sempre se dispor a ajudar.

A Simone Fernandes, que não mediu esforços para ajudar no início dos experimentos. Obrigada por tornar esses momentos mais agradáveis.

Ao Nelson Pellet, pela educação, gentileza e presteza para com todos que o procuram.

A Mariângela Souza, amiga sempre disposta a ajudar.

A Tatiana Karla Borges, companheira de laboratório, por suas palavras de força, por sempre se dispor a ajudar e pelos momentos de risadas e descontrações.

A estagiária Gleise que chegou a pouco, porém, muito me auxiliou nesses momentos finais.

A todos os estagiários que cuidaram dos animais durante o período de experimentação.

Aos alunos e estagiários Andrea, Danilo, Marcelo, Mayara, Talyta pelos momentos de descontração.

Ao Siqueira, pelas lamínulas confeccionadas.

Aos funcionários do laboratório de Dermatocologia, Tércio e Dalila, pela ajuda com o cultivo das leishmânias.

A Jaqueline, Danielle e Alessandro pela boa vontade e auxílio com a parte burocrática e, pelos conselhos e palavras de incentivo.

A prof^a Dr^a Kelly Magalhães e Prof^o José Raimundo Corrêa por me ensinar novas técnicas, pelos materiais e tempo doados para alguns experimentos.

A todos àqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização desse sonho. O meu MUITO OBRIGADA, QUE DEUS ABENÇOE A TODOS.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
INTRODUÇÃO.....	1
1. Epidemiologia das leishmanioses.....	2
2. Entrada no hospedeiro vertebrado e resposta imunitária.....	3
2.1 Índice de infecção.....	8
2.2 Óxido nítrico.....	9
2.3 Peróxido de hidrogênio.....	11
3. Modelos murinos.....	13
JUSTIFICATIVA.....	16
OBJETIVOS.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
Delineamento experimental.....	20
Animais.....	21
Cultivo de <i>Leishmania amazonensis</i> para utilização nas infecções dos macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	22
Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	23
Índice de infecção dos macrófagos peritoneais pela <i>Leishmania amazonensis</i>	23
Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	25
Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	26
Curva de crescimento <i>in vitro</i> das leishmânias recuperadas dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção <i>in vitro</i> com os parasitos.....	27
Número de macrófagos aderidos às lamínulas após 24 h de incubação.....	28
Análise estatística.....	28
RESULTADOS.....	30
1.ÍNDICE DE INFECÇÃO.....	31

1.1	Avaliação <i>in vitro</i> da cinética da interiorização das leishmânias pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) nas primeiras 24h de incubação.....	31
1.2	Avaliação <i>in vitro</i> da cinética da interiorização das leishmânias pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) nas primeiras 24h de incubação.....	33
1.3	Comparação entre o índice de infecção <i>in vitro</i> dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) e C57BL/6 (resistentes) para <i>Leishmania amazonensis</i> nas primeiras 6h de incubação.....	35
1.4	Comparação entre o índice de infecção <i>in vitro</i> dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) e C57BL/6 (resistentes) para <i>Leishmania amazonensis</i> após 24h de incubação.....	37
2-	Curva de crescimento das <i>Leishmania amazonensis</i> recuperadas dos macrófagos de camundongos resistentes (C57BL/6) ou suscetíveis (BALB/c) após infecção.....	38
3-	TAXA DE ADERÊNCIA.....	41
3.1	Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação na presença ou não de <i>L. amazonensis</i>	41
3.2	Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação na presença ou não de <i>L. amazonensis</i>	42
3.3	Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetíveis) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação sem <i>L. amazonensis</i>	43
3.4	Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetíveis) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação com <i>L. amazonensis</i>	44
4-	ÓXIDO NÍTRICO.....	45
4.1	Caracterização da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c em 24 h.....	45
4.2	Influência da infecção pela <i>Leishmania amazonensis</i> na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	46
4.3	Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pela <i>L. amazonensis</i> pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	47
4.4	Caracterização da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em 24 h.....	48

4.5	Influência da infecção pela <i>Leishmania amazonensis</i> na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.....	49
4.6	Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pela <i>L. amazonensis</i> pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 h.....	50
4.7	Comparação da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais entre os camundongos BALB/c e C57BL/6 nas primeiras 24 h.....	51
4.8	Comparação da cinética de produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais estimulados pela <i>L. amazonensis</i> entre camundongos BALB/c e C57BL/6 em 24.....	52
5-	PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	54
5.1	Cinética de produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, nas primeiras 24 horas.....	54
5.2	Influência da infecção pela <i>Leishmania amazonensis</i> na produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, nas primeiras 24h de incubação.....	55
5.3	Comparação entre a cinética de produção de peróxido de hidrogênio basal e estimulada pela <i>L. amazonensis</i> , pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C durante as primeiras 24h de incubação.....	56
5.4	Cinética da produção basal de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 nas primeiras 24 horas.....	57
5.5	Influência da infecção pela <i>Leishmania amazonensis</i> na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, nas primeiras 24h de incubação.....	58
5.6	Comparação entre a cinética da produção basal e da estimulada pela <i>L. amazonensis</i> de peróxido de hidrogênio, pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 durante as primeiras 24h de incubação.....	59
5.7	Comparação da produção basal de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais entre camundongos BALB/c e C57BL/6 em 24 horas.....	60
5.8	Comparação da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais estimulados pela <i>Leishmania amazonensis</i> entre camundongos BALB/c e C57BL/6, nas primeiras 24 h de incubação.....	61
	DISCUSSÃO.....	63
	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
	ANEXO.....	93

Lista de figuras

Figura 1: Delineamento experimental

Figura 2: Avaliação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 6h e 24h de incubação.

Figura 3: Avaliação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 6h e 24h de incubação.

Figura 4: Comparação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 6 h de infecção.

Figura 5: Comparação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 24 h de infecção.

Figura 6: Curva de crescimento de *Leishmania amazonensis* recuperadas de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (BALB/c) após infecção.

Figura 7: Comparação entre quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não pela *L. amazonensis* que permaneceram aderidos à lamínulas após 24 h de incubação.

Figura 8: Comparação entre quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 aderidos à lamínulas infectados ou não pela *L. amazonensis*.

Figura 9: Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (susceptível) aderidos após 24 h de incubação, na ausência das *L. amazonensis*.

Figura 10: Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (susceptível) aderidos à lamínula após 24 h de incubação com *L. amazonensis*

Figura 11. Cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (susceptíveis) em 24 h.

Figura 12: Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Figura 13: Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pelos macrófagos peritoneais infectados ou não com *Leishmania amazonensis*.

Figura 14: Cinética de produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em 24 h.

Figura 15: Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

Figura 16: Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados ou não com *L. amazonensis*.

Figura 17: Comparação da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 24 h.

Figura 18: Comparação da cinética de produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados pela *L. amazonensis*.

Figura 19: Cinética de produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, suscetíveis à *Leishmania amazonensis*.

Figura 20: Influência da infecção por *L. amazonensis* na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Figura 21: Comparação da cinética da produção basal de peróxido de hidrogênio e da estimulada pela *L. amazonensis*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C durante as primeiras 24h de incubação.

Figura 22: Cinética da produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, resistentes à infecção por *Leishmania amazonensis*.

Figura 23: Influência da infecção pela *L. amazonensis* na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

Figura 24. Comparação da cinética da produção basal e estimulada de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados pela *Leishmania amazonensis in vitro*.

Figura 25: Comparação da produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (B) e C57BL/6 (C) por 24 h.

Figura 26: Comparação da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulada pela *Leishmania amazonensis* nas primeiras 24 h de incubação.

Lista de abreviaturas e siglas

AGE- produtos finais de glicação avançada
BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*
cNOS – Sintase óxido nítrico constitutiva
CPH – complexo principal de histocompatibilidade
ERO - Espécies reativas de oxigênio
FcR- Receptor Fc
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HO. – hidroxil
HO₂ . hidroperoxila
IFN- γ – Interferon γ
IgG- Imunoglobulina G
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
iNOS – Sintase óxido nítrico induzível
LPG – Lipofosfoglicano
LPS – lipopolissacarídeo
LTA-1 – Linfócito T auxiliar tipo 1
LTA-2 – Linfócito auxiliar tipo 2
MAF- fator ativador de macrófago
MRF- receptor de mannose-fucose
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH – hidróxido de sódio
NK- células Natural Killer
NMMA - N-monomethyl-L-arginine

NO- óxido nítrico

NOS 2 – Sintase óxido nítrico 2

O₂⁻ - ânion superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

PAMP – padrões moleculares de patógenos

PBMC – monócitos de sangue periférico

PKC α - Proteína kinase C α

ROS – espécies reativas de oxigênio

SOD – superóxido dismutase

STF – Salina tamponada com fosfato

SFB – soro fetal bovino

TDM – dimicolato de trealose

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TNK – Linfócitos T natural killer

RESUMO

A leishmaniose é endêmica em várias partes do mundo, e ainda nos dias atuais a doença permanece um sério problema de saúde pública. A doença tem diferentes formas clínicas, afeta cerca de 12 milhões de pessoas no mundo com um aumento de 1,5 a 2 milhões de novos casos ao ano. A *Leishmania amazonensis* é uma das espécies causadora da leishmaniose tegumentar americana que pode manifestar a forma cutânea ou difusa dependendo do estado imunológico do indivíduo. A imunidade inata participa da defesa inicial contra o parasita e pode determinar a evolução da doença. Camundongos da linhagem BALB/c são suscetíveis à infecção pela leishmânia desenvolvendo uma forma disseminada que evolui para morte, enquanto que camundongos C57BL/6 possuem características de resistência parcial, desenvolvem lesão, porém exercem controle sobre o crescimento do parasito, evoluindo para a cura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune inata dos macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes nas primeiras 24 h de contato do parasita com o fagócito. De 14 camundongos BALB/c e C57BL/6 foram obtidos macrófagos peritoneais para análise do índice de infecção, da capacidade microbicida dos macrófagos dos dois modelos e capacidade de produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio na presença ou ausência da *Leishmania amazonensis*. Não houve diferença no índice de infecção dos macrófagos dos camundongos dos dois modelos estudados. A capacidade microbicida dos macrófagos obtidos dos camundongos resistentes foi mais efetiva do que a dos macrófagos dos camundongos suscetíveis, sendo que observamos um retardo e um menor crescimento em cultura dos parasitos recuperados dos macrófagos dos animais resistentes, que foram estatisticamente significantes a partir do quarto dia de acompanhamento. Ocorreu produção inicial de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis à infecção na presença de *L. amazonensis*, entretanto, estes animais não conseguiram manter a produção deste radical após 24 h em cultura, ocorrendo uma modulação negativa da produção deste radical na presença da leishmânia. Enquanto a produção do NO pelos macrófagos dos animais resistentes aumentou progressivamente e manteve-se 24 horas após. A produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 foi maior do que o dos camundongos BALB/c mesmo quando infectados com *L. amazonensis*. Concluímos que a interação da *Leishmania amazonensis* com os macrófagos modulou negativamente a produção de óxido nítrico em camundongos suscetíveis, mas não nos camundongos resistentes. Os macrófagos dos camundongos C57BL/6, resistentes à leishmânia, foram capazes de eliminar o parasito mais eficientemente do que os macrófagos da linhagem suscetível BALB/c. A produção precoce mais elevada de H₂O₂ e a capacidade de manter a resposta de NO por tempo mais prolongado parecem ter sido fatores importantes para a resposta de suscetibilidade ou resistência a *Leishmania amazonensis*. Nossos dados, portanto, contribuíram para esclarecer alguns mecanismos iniciais envolvidos nas respostas de suscetibilidade ou resistência à infecção pela *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is endemic in several parts of the world and still remains an important health problem. The disease affects about 12 million people worldwide, with an increase of 1.5 to 2 million new cases by year. There are different clinical forms of the disease depending on the host, parasite species, and immunological response to infection. The innate immunity response is responsible by the initial defense against the parasite and may determine the evolution of the disease. BALB/c mice are susceptible to *Leishmania* infection and show disseminated disease that progress to death, whereas C57BL/6 mice show partial resistance to the disease, develop lesions, but control the growth of the parasite evolving to healing. This work aimed to evaluate the innate immune response of macrophages from susceptible or resistant mice during the first 24h in culture. The macrophage infection rate, the microbicidal activity of macrophages, and the nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages of 14 BALB/c and 14 C57BL/6 mice were in vitro assessed in presence or absence of *Leishmania amazonensis*. There was no difference in macrophage infection rate by *Leishmania* between both models evaluated. The microbicidal capacity of macrophages from resistant mice was more effective than that of macrophages from susceptible animals, which showed statistical difference in the fourth day. Enhanced nitric oxide production by peritoneal macrophages from BALB/c susceptible mice stimulated with *L. amazonensis* occurred at the beginning of the incubation, but there was a decrease in production after that, showing a downmodulation of nitric oxide production by *Leishmania* in this mouse model. However, differently, the nitric oxide production by C57BL/6 resistant mice gradually increased until 24 h. The hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages from C57BL/6 mice was higher than that of BALB/c mice when infected with *L. amazonensis*. We conclude that the interaction of macrophages with *Leishmania amazonensis* downmodulates nitric oxide production in susceptible but not in resistant mice. Furthermore, macrophages from C57BL/6 mice resistant to *Leishmania* were able to eliminate the parasite more efficiently than macrophages from the susceptible strain BALB/c. The higher early production of H₂O₂ and the capacity to maintain NO production for a longer period appear to be important factors in the response of susceptibility or resistance to *Leishmania amazonensis*. Our data therefore may clarify some mechanisms involved in the initial responses of susceptibility or resistance to *Leishmania amazonensis* infection.

INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia das leishmanioses

A infecção pelo parasita causador da leishmaniose é endêmica em várias partes do mundo, e ainda nos dias atuais a doença permanece um sério problema de saúde pública em muitos países (Ouellette et al, 2004, Goto e Lindoso, 2010, Alvar et al, 2012). A doença, em diferentes formas clínicas, afeta cerca de 12 milhões de pessoas no mundo com um aumento de 1,5 a 2 milhões de novos casos ao ano (WHO, 2007).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, no período de 2000 a 2008, foram registrados 238.749 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), com média anual de 26.528 novos casos sendo o norte e nordeste as regiões com maiores percentuais de casos no país com aproximadamente 70% dos casos confirmados nesse período. A Leishmaniose Visceral ou Calazar (LV) em 2008 foram registrados 3.852 casos autóctones. O maior número de casos está na região Nordeste, apesar disso, ao se analisar a série histórica observa-se uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de confirmados em 2000, para 45% (1.739/3.852) em 2008. A doença vem se expandindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48% (1.863/3.852) em 2008 (SVS/MS, 2010). No DF, entre 2005 e 2008 foram relatados 316 casos confirmados de leishmaniose visceral sendo que desses, 5% foram casos autóctones. As transmissões no DF aumentaram nas cidades satélites de Sobradinho I e II, Varjão, Ceilândia e Brazlândia nesse mesmo período, porém o local provável de infecção não foi estabelecido (Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, 2009). No primeiro semestre de 2012, 20 casos foram confirmados de Leishmaniose Visceral no DF, sendo 4 autóctones das regiões administrativas Fercal (1), Sobradinho (2) e Lago Sul (1), 14 casos vindos de outros estados como Goiás, Bahia, Minas Gerais e 2 casos de localidade ignoradas e, de 19 casos de LTA, 15 foram casos vindos de outros estados e ocorreram também 4 casos

autóctones nas regiões de Santa Maria (1), Taguatinga (1), São Sebastião (1) e Sobradinho (1) (SES/DF, 2012).

As leishmanioses são zoonoses de animais silvestres e mais raramente domésticos. A manutenção dos parasitos na natureza não se deve ao homem, sendo este considerado um hospedeiro acidental. As diferentes manifestações das doenças são dependentes de fatores de virulência do próprio parasito e da resposta imune estabelecida pelo hospedeiro (Gontijo e Carvalho, 2003). Possui várias formas de apresentação clínica: tegumentar (cutânea, cutâneo-mucosa e difusa) e visceral, sendo que na forma cutâneo-mucosa podem ocorrer mutilações graves e mesmo o óbito e na forma visceral da doença pode ocorrer óbito se não tratada (Herwaldt, 1999; Cunningham, 2002).

As leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania* que possui mais de 21 espécies conhecidas patogênicas para o homem. A *Leishmania amazonensis* é uma das espécies causadora da leishmaniose tegumentar americana que pode se manifestar como forma cutânea ou difusa, dependendo do estado imunológico do indivíduo (Macedo-Silva et al, 2011).

O ciclo de vida do parasito é digenético, possuindo hospedeiro vertebrado (principalmente mamíferos) e invertebrado (insetos do gênero *Lutzomyia sp.*). É um parasito intracelular obrigatório com duas morfologias distintas, a promastigota e a amastigota. A forma promastigota possui um flagelo e se multiplica no trato digestório do inseto vetor, enquanto que a forma amastigota não possui flagelo e se encontra no interior de fagócitos mononucleares do sistema imunitário do hospedeiro mamífero (Umakanti and Singh, 2009).

2. Entrada no hospedeiro vertebrado e resposta imunitária

Os fagócitos são células essenciais que compõem o sistema imunitário inato e são capazes de realizar a fagocitose. São células que reconhecem o parasito por receptores

presentes na membrana plasmática, entre eles os receptores para padrões moleculares de patógenos (PAMP) que reconhecem antígenos de diversos microorganismos. Uma vez reconhecido, a membrana do patógeno se liga em receptores na membrana do fagócito e ocorre a formação de um vacúolo, que abriga o patógeno, o fagossomo. O lisossomo, contendo as enzimas digestivas, funde-se com o fagossoma, formando o fagolisossoma ou vacúolo parasitóforo, criando um ambiente ácido, rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas, além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que irão destruir o microorganismo invasor (Handman e Bullen, 2002).

Ao ser inoculado na pele pelo inseto vetor, a forma promastigota interage com componentes do soro, dentre eles os componentes do sistema do complemento. Estudos demonstraram que nos primeiros três minutos da infecção com *L. major*, 90% das leishmânias são eliminadas pelo complexo de ataque a membrana formado pelo complexo C5b a C9 (Dominguez, 2003).

Porém, a forma infectante promastigota metacíclica é mais resistente à lise pelo sistema complemento. A lipofosfoglicana (LPG) do parasito na forma metacíclica possui β -galactose em sua porção terminal recoberta pela α -arabinose o maior número de repetições nas unidades de dissacarídeos confere resistência à estas formas (Awasthi et al, 2004).

Devido a essa característica de resistência ao complemento, as promastigotas metacíclicas utilizam a opsonização pela proteína C3b do complemento para entrar na célula alvo, pela ligação ao seu receptor na membrana do fagócito. Assim, a leishmânia escapa da ação microbicida do fagócito, pois a interiorização por meio dos receptores para o complemento não ativa as vias de destruição do patógeno no fagócito (Maurer et al, 2009).

Uma vez interiorizada, a promastigota metacíclica se transforma na forma resistente amastigota, que tem em sua membrana a proteína gp63, que possui ação proteolítica para degradar enzimas lisossomais, dando à amastigota resistência para sobreviver no ambiente

ácido do fagolisossoma (Awathi et al, 2004; Umakanti and Singh, 2009). Outro mecanismo de escape do parasito é a inibição da fusão do fagosossoma com o lisossoma (Nylén e Akuffo, 2009), como também, a capacidade do parasito de diminuir a atividade da enzima sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), responsável pela produção do óxido nítrico, importante agente leishmanicida produzido quando macrófago está ativado (da Silva, 2010).

A literatura ainda é controversa em relação a qual célula é responsável para interação inicial com o parasito. Estudos recentes têm sugerido que os neutrófilos são as primeiras células a serem infectadas pela leishmânia (Peters et al, 2008), enquanto que muitos sugerem que os macrófagos da pele são os primeiros a terem contato com o parasito (Nylén e Akuffo, 2009). Em contraste, os resultados de Peters et al sugerem que *in vivo* as células dendríticas são as principais células infectadas pela leishmânia e que os neutrófilos possuem papel limitado frente a esse patógeno (Ng et al, 2008). Trabalhos indicam que os neutrófilos se tornam incapazes de produzir grânulos microbicidas quando infectados com *L. major*, não sendo capaz de matar o parasito (Molhedo et al, 2010).

Para eliminar o patógeno interiorizado é necessário que o macrófago apresente o antígeno para os linfócitos T auxiliares CD4⁺ (LTCD4), que ao reconhecer o antígeno ligado ao complexo principal de histocompatibilidade II (CPH), secretam citocinas que irão ativar o macrófago para produzir substâncias microbicidas, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, entre outros radicais de oxigênio e nitrogênio.

Os linfócitos T auxiliares CD4 são classificados em duas subpopulações: linfócitos T auxiliares 1 (LTA1) ou 2 (LTA2), de acordo com as citocinas que secretam quando reconhecem o antígeno ligado ao CPH II apresentado pelo fagócito. O LTA1 secreta citocinas próinflamatórias, sendo a principal o IFN γ , potente ativador do macrófago, enquanto que, o LTA2 secreta citocinas, como IL-4 e IL10, que além de promoverem a resposta humoral possuem capacidade antiinflamatória, inibindo a ativação do fagócito.

Em modelos murinos, o paradigma LTA1 *versus* LTA2 está relacionado com uma resposta de resistência ou suscetibilidade à infecção pela *Leishmania major*. Em camundongos C57BL/6 a resposta LTA1, com secreção de IFN γ , irá ativar o macrófago, impedindo o crescimento do parasita, com evolução para a cura. Ao contrário dos camundongos da linhagem BALB/c, que induzem uma resposta principalmente LTA2, com secreção de citocinas antiinflamatórias que inibirão o macrófago, facilitando a multiplicação do parasito e causando lesões que não curam e ocasionando doença (Awasthi et al, 2004).

Em seres humanos com leishmaniose essa polaridade de resposta não é tão evidente. Tanto a resposta dos LTA1 como a resposta dos LTA2 são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta LTA1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta LTA2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- γ modula negativamente a resposta LTA2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta LTA1, o que facilita a homeostasia do sistema imunitário e uma resposta imunológica equilibrada. Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam as moléculas CD4 e CD25 (LTreg) e produzem IL-10 e/ou TGF- β (LTr1 ou LTA3) estão envolvidas na modulação da resposta imunitária, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e das doenças autoimunes (Mills and McGuirk, 2004).

Utilizando camundongos *knockout* para os genes do CPH de classe I (LTCD8) ou CPH de classe II (LTCD4), tem sido demonstrado que animais que eram deficientes do CPH de classe II, e não apresentavam resposta por linfócitos TCD4, quando infectados pela *L. major*, apresentaram uma doença não controlada e fatal. Ao contrário daqueles deficientes na resposta de linfócitos TCD8, que quando infectados controlaram a doença de forma similar

aos camundongos normais, sugerindo que linfócitos TCD4, mas não os TCD8, são requeridos para controlar a infecção por *Leishmania major* (Locksley et al, 1993; Huber et al, 1998)

Há estudos que investigaram a ativação do macrófago para destruição do patógeno nos estágios iniciais da infecção, período em que a resposta imunitária adaptativa ainda não foi estimulada (Horta et al, 2011). Maior quantidade de *L. major* foi encontrado em macrófagos deficientes em iNOS do que em macrófagos normais, após 72 h da infecção, demonstrando que o NO é produzido pelo macrófago sem ter sido ainda ativado pelo IFN- γ produzido pelos LTA1, e mesmo em baixas concentrações, o NO tem capacidade de inibir o crescimento do parasito (Wei et al, 1995).

O IFN- γ produzido pelo LTA1 induz a expressão de iNOS, que estimulará a produção de óxido nítrico a partir de L-arginina, que provocará a destruição de microorganismos, enquanto que, principalmente a IL-4, secretada pelo LTA2, induzirá a expressão de arginase, que é responsável pela produção de uréia e outros metabólitos, agindo como uma enzima regulatória e modulando a disponibilidade de L-arginina na célula para produção do NO. Dessa forma, é possível que o padrão de resposta LTA2 favorecerá a leishmânia, porque diminuirá a quantidade de L-arginina disponível para a produção do óxido nítrico, fazendo com que a célula não consiga eliminar o agente invasor (Wanasen and Soong, 2008).

Testes utilizando células de linhagens de camundongos que apresentam padrão de resposta LTA1 ou LTA2 demonstraram que os macrófagos de camundongos BALB/c, que apresentam uma resposta LTA2, não produzem NO e aumentam a produção de ornitina/ureia (via anti-inflamatória) quando estimulados com IFN- γ ou LPS. Por outro lado, para os macrófagos de camundongos C57BL/6, que apresentam resposta LTA1, ocorre resposta oposta ao estímulo de IFN- γ e LPS, os níveis de ornitina diminuem e aumenta a produção de L-citrulina/NO (resposta pró-inflamatória) (Mills et al, 2000).

2.1 Fagocitose

Handman et al (1979) observaram avaliando a infecção por *L. tropica* que as diferenças na resposta imunitária entre linhagens suscetíveis ou resistentes não é devido à menor ou maior entrada do parasito na célula hospedeira, e sim, a fatores microbicidas que são diferentes entre os modelos, e por isso, geram perfis diferentes frente ao mesmo parasito.

Beil et al (1992) demonstraram diferenças no tipo de célula presente na lesão leishmaniótica em camundongos suscetíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL/6), infectados com *L. major*. No estágio inicial, os neutrófilos estão presentes no infiltrado inflamatório no camundongo BALB/c, enquanto que nos C57BL/6, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos são as células predominantes. Após 2 dias de infecção, na lesão dos camundongos suscetíveis havia 2 vezes mais leishmânias intactas do que na lesão dos resistentes.

A capacidade fagocitária de monócitos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose foi duas vezes menor devido a menor quantidade de células envolvidas no processo do que a de indivíduos controles normais. Porém, quando os indivíduos com leishmaniose foram tratados com o glucantime, houve aumento significativo da capacidade de fagocitar leveduras pelos monócitos dos pacientes (Saldanha, 2009). Em modelos murinos, a fagocitose pelos macrófagos peritoneais tanto pelos receptores para opsoninas quanto por receptores para PAMPs estava aumentada em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. O contrário foi observado para os macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, não foi observado aumento da capacidade fagocitária no grupo infectado em relação ao grupo controle (Saldanha, 2009).

Poucos trabalhos analisam a atividade fagocitária de macrófagos de camundongos. É importante esclarecer a função fagocitária na infecção pela leishmânia, pois a fagocitose pelos macrófagos é o mecanismo principal para a eliminação dos parasitos, mediado pela produção

de metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (Wilson, 1991; 1994; Bhattacharyya et al, 2002;)

2.2 Óxido nítrico

O NO é encontrado em estado gasoso, possui solubilidade moderada em água e em sistemas biológicos tem característica lipofílica. O NO é uma molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência, que possui um elétron não-emparelhado. Seu caráter radicalar lhe confere uma alta reatividade (meia-vida de 5 a 10 segundos *in vitro*), especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular (O_2) e ânion superóxido (O_2^-). O NO pode também complexar-se com metais de transição como o ferro, transferindo o elétron desemparelhado para os orbitais *d* vazios do metal (Barreto e Correia, 2005).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e óxido nítrico. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Dusse et al, 2003). A arginase é uma enzima que compete com a iNOS pela oxidação de L-arginina, nesse caso, quando a arginase catalisa a reação da L-arginina o produto é L-ornitina (estimulada por um padrão de resposta LTA-2) (Wanasen, 2008).

Iniesta et al. (2001; 2002) demonstraram que a indução da arginase favorece a replicação das leishmânias dentro do macrófago, e avaliando a expressão diferencial da

arginase no tecido de camundongos susceptíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), demonstraram aumento da enzima em ambos, mas no camundongo BALB/c ocorreu aumento da enzima em paralelo com o tempo de infecção, enquanto que no camundongo C57BL/6 a enzima estava aumentada apenas durante o período de edema da pata dos camundongos (Iniesta et al, 2001; Iniesta et al, 2002; Iniesta et al, 2005).

O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (James, 1995). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas. O $ONOO^-$ pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil ($HO\cdot$), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- (Beckman and Koppenol, 1996). A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas.

Vários trabalhos têm demonstrado que a atividade microbicida contra as formas intracelulares da leishmânia é mediada principalmente pelo óxido nítrico (James, 1995). O tratamento de camundongos infectados com *L. major* com um inibidor da iNOS, N-monomethyl-L-arginine (NMMA), resultou em aumento da carga parasitária e no

desenvolvimento de lesões cutâneas maiores (Liew et al, 1990). Stenger et al (1994) analisando por imunohistoquímica, utilizando anticorpos contra iNOS em tecido de lesão e de linfonodos, observaram expressão precoce e em maior quantidade da iNOS em camundongos resistentes à *L. major* do que naqueles suscetíveis.

Días e cols. (2003) demonstraram *in vivo* a produção de óxido nítrico pelos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectadas com *L. mexicana* e sua relação com uma resposta mediada por LTA1, do tipo próinflamatório ou mediada por LTA2, do tipo antiinflamatório. Stenger et al observaram que em camundongos com características de resistência, C57BL/6, C3H e CBA, mesmo quando a produção do óxido nítrico é inibida, ainda ocorre a limitação da infecção pela *L. major*, ao contrário dos camundongos BALB/c, que desenvolvem a forma visceral da doença.

Sarkar e colaboradores (2011) analisaram a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, e observaram que na presença do parasito essas células inibem a produção de NO favorecendo o seu crescimento. Avaliaram também, a produção de NO em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose visceral, e observaram que nesses pacientes a produção de óxido nítrico também é menor do que pelas células de indivíduos saudáveis.

Saldanha (2009) demonstrou que macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis (BALB/c) infectados com *L. amazonensis* produzem menos óxido nítrico quando estimulado com LPS do que os macrófagos dos animais que não foram infectados pelo parasito, enquanto que não houve diferença na produção basal deste radical pelos macrófagos dos camundongos resistentes (C57BL/6).

2.3 Radicais de hidrogênio

Espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos e em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse último possui uma vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligada ao ferro. O peróxido é um metabólito de oxigênio extremamente deletério devido a sua participação na reação que produz o radical OH^{\cdot} (Ferreira e Matsubara, 1997) e é formado a partir da dismutação do O_2^- , uma reação catalizada pela enzima dismutase de superóxido (SOD) (Assche et al, 2011).

Estudos in vitro demonstraram o efeito tóxico direto do ânion superóxido (O_2^-) e do H_2O_2 na leishmânia. A suscetibilidade foi dependente do estágio do parasito, as promastigotas metacíclicas foram mais resistentes comparadas com as procíclicas e ainda, observaram que o H_2O_2 tem um efeito mais tóxico do que o O_2^- (Wilson et al, 1994).

Murray (1981) observou que as *L. tropica* e *L. donovani* eram suscetíveis, dose dependente, ao H_2O_2 e ainda que a leishmânia induziu a produção de radicais de oxigênio por macrófagos infectados. Ao inocular essas duas espécies de leishmânia em camundongos das linhagens suscetível (BALB/c) e resistentes (DBA e CBA) não observou diferença na produção de H_2O_2 pelos macrófagos.

Das et al (2001) demonstraram que o peróxido de hidrogênio é tóxico para *L. donovani*, degrada DNA e ativa a via das caspases, levando a leishmânia à morte por apoptose.

Domingues et al (2010) avaliando a produção de PKC α , enzima que participa da produção de radicais de oxigênio, observaram que tanto nos macrófagos dos camundongos

BALB/c quanto nos macrófagos dos camundongos C57BL/6 há produção dessa enzima quando estimulados com *L. mexicana*. Porém, a atividade dessa enzima é diferente entre as duas linhagens, sendo que nos macrófagos dos camundongos C57BL/6 a enzima está aumentada, ocorrendo conseqüentemente aumento também na explosão oxidativa, refletindo na eliminação do parasito pelos macrófagos dos camundongos C57BL/6 e não dos camundongos BALB/c (Domínguez et al, 2010).

A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos do sangue periférico de pacientes com LTA apresentam produção basal desse radical mais elevada do que os monócitos de indivíduos normais e a resposta foi a mesma quando esses monócitos foram estimulados com PMA (Saldanha, 2009). Isso sugere que o peróxido de hidrogênio possa estar envolvido na patogênese da lesão.

3-Modelos animais

O aumento dos estudos sobre o papel que os aspectos genéticos determinam na patogênese da leishmaniose foi propiciado pelo uso de modelos murinos isogênicos. A disponibilidade de linhagens com a fisiologia, imunologia e mapa genético bem definidos faz dos camundongos modelos ideais para investigação laboratorial. Além disso, espécies de leishmânia infectantes para ao homem podem causar padrões semelhantes da doença em camundongos, por isso, linhagens puras de camundongos têm servido para imitar naturalmente os fenótipos de suscetibilidade completa, suscetibilidade intermediária e resistência a doenças em humanos (Handman et al, 2009).

Porém, no estudo da leishmaniose cutânea nos camundongos, três modelos são comumente utilizados. Nesses modelos a resistência é mensurada pela habilidade de controlar o crescimento da lesão no sítio da inoculação, além do controle da carga parasitária e o estabelecimento da resposta imunitária adaptativa (Handman et al, 2005).

Na infecção por *L. major*, camundongos da linhagem C57BL/6 apresentam um perfil de resistência associada à resposta imunitária dirigida por LTA-1 (pró-inflamatória) não desenvolvendo lesão, ao contrário dos camundongos da linhagem BALB/c que, quando infectados com a mesma espécie, desenvolve lesão que pode evoluir para a morte, devido a uma resposta dirigida pelo padrão LTA-2 (anti-inflamatória) (Liew et al, 1990).

Entretanto, quando camundongos C57BL/6 são infectados com *L. amazonensis* esse padrão de resistência não é tão evidente. É observado que os indivíduos formam lesões, porém o sistema imunológico consegue estabelecer uma resposta anti-leishmânia, fazendo com que a lesão regrida. O que não ocorre com os camundongos BALB/c, assim como na infecção por *L. major*, estes ficam seriamente doentes quando infectados por *L. amazonensis* (McElrath et al, 1987).

É evidente que há fatores do parasito que influenciam na suscetibilidade ou não à doença, porque camundongos BALB/c são resistentes à infecção pela *L. braziliensis* devido à ausência da resposta LTA-2 e não pelo estabelecimento de uma resposta LTA-1 (Dekrey et al, 1998). Assim, como quando infectados com *L. guyanensis*, também não apresentam lesões, e parecem ser capazes de eliminar o parasito (Sousa-Franco et al, 2006).

Nos modelos experimentais, existem linhagens que respondem diferentemente frente ao mesmo parasito devido a características genéticas individuais. Como ocorre com os camundongos BALB/c e C57BL/6, que, quando infectados com a *L. major*, o primeiro desenvolve uma doença disseminada evoluindo para a morte, enquanto o segundo, apresenta uma doença limitada, que naturalmente evolui para a cura (Lipoldová and Demant, 2006).

Vários trabalhos têm analisado os possíveis fatores que seriam responsáveis pelas diferentes respostas encontradas, utilizando vários modelos animais e espécies de leishmânias, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Estudos de fatores imunológicos em diferentes modelos murinos desafiados com diferentes estímulos.

Estímulo	Linhagem	NO	H2O2	fagocitose	Referência
LPS	BALB/c	↓NO; ↓iNOS. (MP)*			Santos et al., 2006.
	C57BL/6	↑NO ↑iNOS (MP)*			
<i>L. major</i>	Balb/c	↑ Arginase ↓ iNOS (lesão tecidual)		capacidade fagocitária= ; C57BL/6 elimina a leishmania e o BALB/c não.	Iniesta et al., 2005; Liew et al, 1990. Stenger et al. Steffen et al, 1994; Días et al, 2002; Beil et al., 1992.
	C57BL/6	↑iNOS (lesão tecidual)			
<i>L.tropica</i>	BALB/c		ERO =	início da infecção = no dia 7 ↓ células infectadas C57BL/6	Murray, 1981; Handman et al., 1979.
	C57BL/6				
<i>L. mexicana</i>	BALB/c		Inibe a enzima PKCα ↓ERO, ↑ sobrevivência do parasito. (MP)*		Dominguez et al., 2010.
	C57BL/6		↑atividade de PKCα, ↑ produção de ERO ↓sobrevivência do parasito (MP)*		
<i>L. d. chagasi</i>			In vitro, são suscetíveis ao peróxido de hidrogênio pela produção de radical hidroxil		Zarley et al, 1991.
<i>S. tiphimurium</i>	C57BL/6	Mais importante para matar a bactéria e produzida em tempos mais tardios da infecção	Produzido horas depois da infecção, não é mantida a pdução, mas sinergiza com a atividade do NO para eliminar a <i>Salmonella</i> .		Vazquez-Torres et al, 2000.
<i>L. amazonensis</i>	BALB/c	↓NO em estágios mais tardios na lesão.	↓ ERO por macrófagos infectadas com L.A. do que com L.G. **		Giorgio et al, 1998. Sousa-Franco et al, 2006.
	C57BL/6	↑ NO estágio inicial da infecção e permanece presente em menor concentração nos estágios finais.			
<i>L. donovani</i>	BALB/c	É inibida a produção de NO pelos macrófago peritoneais infectados.	Estimula a produção desse radical de forma semelhante nas células das duas linhagens. E ROS é toxico degradando DNA.		Bhattacharyya et al., 2002; Murray, 1981; Das et al., 2001 Sarkar et al., 2011.
	C57BL/6				
<i>L. guyanensis</i>	BALB/c	produz NO mas a morte do parasito não está envolvida com o NO;	induziu a explosão oxidativa de macrófagos peritoneais capaz de eliminar o parasito.		Sousa-Franco et al., 2006.
	Camundongos com DGC e/ou iNOS-/-	Na ausência de iNOS não controlaram a infecção.	mesmo na ausência de ROS, conseguiram conter a leishmânia. Mas na formação do granuloma nenhum dos camundongos obtiveram sucesso. NO e ROS trabalham em sinergia.		Murray and Nathan, 1999.
<i>L. chagasi</i>		São suscetíveis a atividade de H2O2 e O2 in vitro na fase promastigota procíclica.			Wilson et al., 1994.
TDM (ativador de macrófago)	BALB/c		50% ↓ peróxido de hidrogênio		Oswald et al, 1992.
	C57BL/6		↑ peróxido de hidrogênio quando estimulado		

* Macrófagos peritoneais; ** LA: *Leishmania amazonensis*, LG: *Leishmania guyanensis*; DGC: Doença Granulomatosa Crônica.

JUSTIFICATIVA

Há ainda muitos aspectos que precisam ser avaliados para esclarecer quais parâmetros são responsáveis pela suscetibilidade ou não à leishmaniose. Aspectos relacionados ao parasito e ao próprio hospedeiro que determinam uma resposta imunitária eficaz ou não.

Embora muitos trabalhos tenham avaliado a resposta imunitária adaptativa já estabelecida, falta ainda esclarecer os aspectos envolvidos nas fases iniciais da infecção pelo parasita e que são realizados pelas células do sistema imunitário inato. O destino da infecção pode ser estabelecido no momento do encontro do parasita com as células do hospedeiro, e a capacidade ou não de conter a infecção e determinar o estabelecimento de uma resposta imunitária eficaz depende de eventos que ocorrem nesta fase da infecção e que não estão ainda totalmente esclarecidos.

A cinética da interação do parasita como os fagócitos nesta fase inicial, a capacidade de resposta microbicida pelos fagócitos do hospedeiro, a cinética da produção de substâncias microbicidas, como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio, ainda precisam ser esclarecidas.

O esclarecimento desses possíveis fatores determinantes da evolução da doença poderá disponibilizar marcadores para a identificação daqueles indivíduos infectados com leishmânia que irão desenvolver a forma grave da doença. Assim como, propiciará a utilização de uma terapêutica precoce e mais adequada, propiciando uma cura mais rápida e melhor qualidade de vida para os indivíduos infectados. Esses marcadores também poderiam auxiliar no desenvolvimento de fármacos que pudessem agir mais pontualmente nos parâmetros que se encontram alterados determinando a doença.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Avaliar *in vitro* a cinética da resposta imunitária inata inicial, nas primeiras 24 horas, em modelo suscetível e em modelo resistente à infecção pela *Leishmania amazonensis*.

Objetivos específicos:

- Avaliar e comparar a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico nas primeiras 24 h pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetível) e C57BL/6 (resistente) infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a cinética da taxa de infecção nas duas linhagens de camundongos.
- Avaliar e comparar a capacidade microbicida dos macrófagos após a interiorização da *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c (suscetível) e C57BL/6 (resistente), pela curva de sobrevivência das leishmânias recuperadas após a interiorização pelos macrófagos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho é um estudo experimental e foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular da área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e foram avaliadas possíveis diferenças na resposta imunitária inata inicial de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) e C57BL6 (resistentes) infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.

Delineamento experimental

A produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico foi avaliada nos tempos de 1h, 6h e 24h após a infecção com *Leishmania amazonensis* enquanto que a taxa de infecção foi avaliada após 6 horas e 24 horas de infecção. Foi também avaliada a capacidade microbicida dos macrófagos pela realização de uma curva de sobrevivência das leishmânias recuperadas após a interiorização pelos macrófagos peritoneais nos dois modelos murinos estudados.

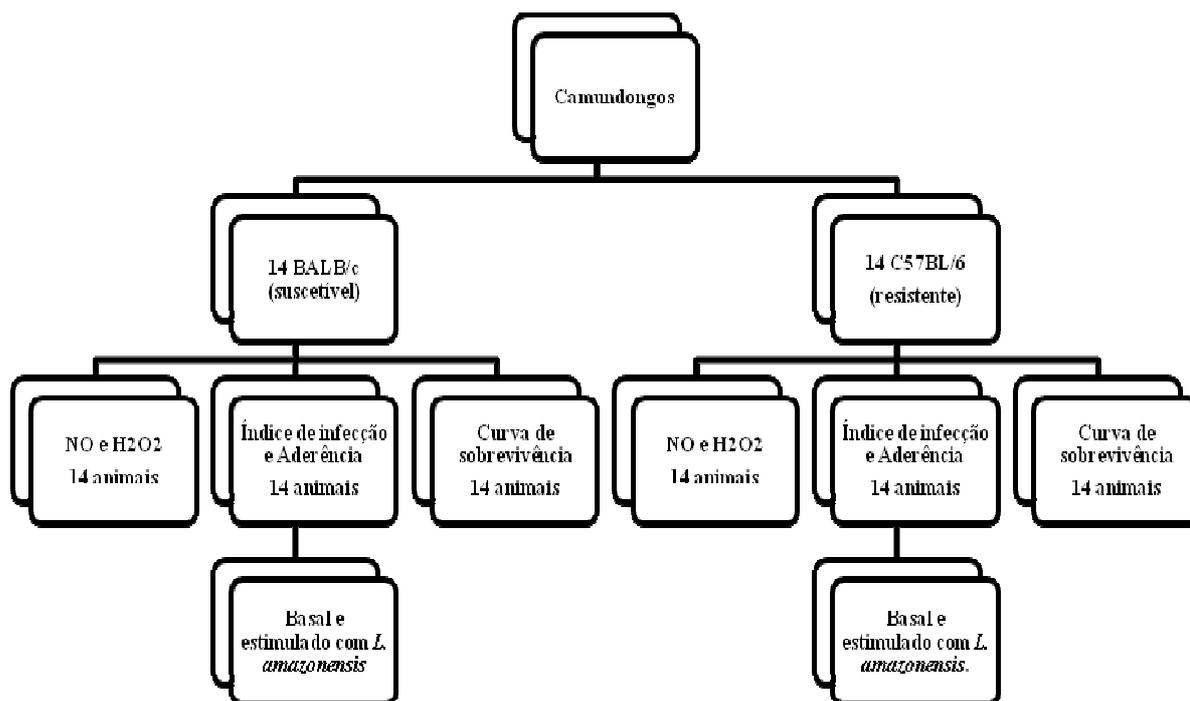


Figura 1: Delineamento experimental.

Animais

Foram utilizados 14 camundongos de cada uma das linhagens BALB/c e C57BL/6, os quais possuem um perfil genético que confere suscetibilidade ou resistência à infecção pela *Leishmania sp.*, respectivamente.

Todos os animais utilizados nesses experimentos foram mantidos em gaiolas coletivas, contendo no máximo dez animais nas gaiolas maiores, com água e ração “*ad libitum*”, sob condições de luz / escuro em ciclo de 12 horas e temperatura de 23-25°C alocados no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

As normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas, conforme determina a lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, os princípios éticos para experimentação animal, definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e a Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética

no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (processo 10920/2012).

Cultivo de *Leishmania amazonensis* para utilização nas infecções dos macrófagos peritoneais *in vitro*

Foi utilizada a *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), gentilmente cedido pelo Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

O parasito era cultivado em meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA) com 20% de soro fetal bovino e 40µg/ml de gentamicina a 26°C. A proporção utilizada em nos experimentos para a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais foi de 10:1 (10 parasitos/macrófago). As leishmânias sempre foram utilizadas para os experimentos quando as culturas estavam na fase estacionária entre 5 a 7 dias, apresentando formas infectantes promastigotas metacíclicas.

Para a utilização nos experimentos, as leishmânias eram centrifugadas por 20 min a 4.000g, o sobrenadante descartado e os parasitos ressuspensos em 1 ml de RPMI 1640 pH 7,2, com 10% de soro fetal bovino à 37°C. As leishmânias eram quantificadas em câmara de Neubauer e diluídas em STF na proporção de 1:25 para contagem. A metodologia foi adaptada da técnica descrita por Khouri et al (2010).

Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais eram eutanasiados com CO₂ e higienizados com álcool 70%. Era feita uma pequena incisão na região central do abdômen do animal para exposição da cavidade peritoneal, onde eram injetados 10 ml de salina tamponada com fosfato (STF) gelada. O líquido recuperado do lavado peritoneal era colocado em tubo de polipropileno de fundo cônico, estéril e centrifugado por 10 min a 200g, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado e as células eram ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640 contendo 2,67 mL/L de bicarbonato de sódio a 7,5% (pH 7,2), a 37°C e sem soro fetal bovino (SFB) (RPMI incompleto). Após a diluição em 1:10 no corante vital nigrosina 0,05% as células eram quantificadas e a viabilidade determinada em câmara de Neubauer. As células eram novamente suspensas em RPMI 1640, pH 7,2 para serem utilizadas nos experimentos (Muniz-Junqueira et al, 1992).

Índice de infecção dos macrófagos peritoneais pela *Leishmania amazonensis*

Após os macrófagos peritoneais serem ressuspensos em RPMI 1640 incompleto, 2×10^5 macrófagos eram distribuídos por poço em placa de 24 poços, contendo lamínulas de 13mm de diâmetro, num volume final de 500 µL. As células eram incubadas por 2 h em câmara úmida, a 37°C em 5% de CO₂ em ar para permitir a aderência dos macrófagos às lamínulas. Após esse período, os poços eram lavados com STF pH 7,2, a 37°C para a retirada das células que não aderiram. Em seguida, para avaliar o índice de infecção pela *Leishmania amazonensis*, eram adicionados 2×10^6 parasitos em 500µl de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C com 10% de soro fetal bovino previamente inativado (RPMI completo). Para quantificar a aderência basal dos macrófagos às lamínulas, foram adicionados apenas 500µl de RPMI completo, sem as

leishmânias. As placas eram incubadas em câmara úmida, à 37°C em 5% a CO₂ em ar e permitida à infecção dos macrófagos pelo tempo de 6 horas.

Em seguida as placas eram lavadas com 5ml de STF a 37°C, para retirar os parasitos que não tinham infectado os macrófagos, ou não estavam fortemente aderidos às células, sendo a última lavagem com RPMI com 30% de SFB, para preservação das preparações. As preparações eram secas em ar quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) e coradas com Giemsa (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a 10% em tampão para coloração por 10 minutos. Paralelamente, em outras placas, após a lavagem das preparações, as células eram ressuspensas em 500µl de RPMI completo e incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 24 horas. Após as 24 horas de incubação, os poços eram lavados 3 vezes com STF a 37°C, sendo a última lavagem com RPMI com 30% de SFB. Em seguida as lamínulas eram secas em ar quente, fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa a 10% em tampão para coloração, por 10 minutos.

As preparações de 6 h e 24 h foram montadas em lâminas de vidro de microscopia com resina sintética (Entellan®, Merck; Sigma, St Louis, MO, USA) e analisadas ao microscópio óptico em objetiva de 100x. Foram contados 200 macrófagos peritoneais por preparação em campos selecionados aleatoriamente e calculado o índice de infecção (IF) pela multiplicação da média de leishmânias interiorizadas e/ou fortemente aderidas aos macrófagos peritoneais pela proporção de macrófagos que estavam interagindo com o parasito. O protocolo foi adaptado de Paula, 2003; Muniz-Junqueira et al, 2008; Santos et al., 2009 e Macedo-Silva et al, 2011.

Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.

Para avaliar a produção de H₂O₂, utilizamos a técnica da oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase.

Os macrófagos peritoneais eram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c e C57BL/6, como descrito acima, e mantidas à 4°C até o momento de utilização. Os macrófagos (1,5x10⁵) eram distribuídos em placas de 96 poços de fundo chato, em duplicata, em 200µl de RPMI incompleto. As placas eram incubadas por 2 horas em câmara úmida, à 37°C em 5% de CO₂ em ar para permitir a aderência dos macrófagos. Após esse período, as escavações eram lavadas 2 vezes com 200µl de STF e em seguida, eram adicionados ou não 1,5x10⁶ *Leishmania amazonensis* em 200µl de RPMI completo. As placas eram incubadas em câmara úmida, à 37°C com 5% de CO₂ em ar por 1 ou 6 h, inicialmente.

Para análise da produção do H₂O₂ na primeira hora, depois de decorrido a primeira hora de incubação com as leishmânias, as escavações eram lavadas 3 vezes com 200µl de STF à 37°C e era adicionado 140 µL de tampão fosfato suplementado com 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 unidades por mL de peroxidase tipo II (Sigma), e a placa era incubada novamente por mais 60 min em câmara úmida, a 37°C em ambiente com 5% de CO₂ em ar. Após esse período, a reação era interrompida pela adição de 10µl de NaOH 1N e, em seguida, a placa era lida em espectrofotômetro de placa (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) com filtro de 620nm. Uma curva padrão para quantificação do H₂O₂ (Merck) era preparada nas concentrações de 100µM, 50µM, 25µM, 12,5 µM, 6,25µM, 3,12µM, 1,56µM e 0µM com vermelho de fenol acrescido de peroxidase tipo II.

Para análise dos outros tempos de 6 e 24 h, as placas eram incubadas com as leishmânias por 6 horas, e após esse período, as escavações eram lavadas 3 vezes com 200µL de STF à 37°C. Para as placas nas quais era analisado o tempo de 6 h, era adicionado 140µl tampão fosfato suplementado com 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 unidades por mL de peroxidase tipo II (Sigma) e incubada novamente por mais 60 min e procedia-se a determinação do peróxido de hidrogênio como descrito acima.

Paralelamente, para análise do tempo de 24 h, após a incubação por 6 h com as leishmânias e a lavagem das preparações, era adicionado 200 µl de RPMI completo e as placas eram incubadas à 37°C em câmara úmida com 5% de CO₂ em ar por mais 24 horas. Após esse período de incubação as placas eram lavadas, era adicionado 140µL de tampão fosfato sob as condições citadas acima e a determinação do H₂O₂ era realizada como descrito acima após 60 min de incubação. Metodologia adaptada das técnicas descritas em Pick, 1981.

Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.

Para determinação do NO foi utilizado o sobrenadante das mesmas culturas que estavam sendo feitas para avaliação da produção do H₂O₂. Em cada um dos tempos avaliados, 1, 6 e 24 horas, os sobrenadantes eram retirados dos poços, colocados em microtubos e centrifugados a 14000 RPM, por 10 minutos para que as leishmânias precipitassem no fundo do tubo. Após a centrifugação, era retirado 100µl do sobrenadante e colocado em placas de 96 escavações de fundo chato, era adicionado 100µl de solução de Greiss [composta de partes iguais de sulfanilamida 2% em H₃PO₄ a

5% e NEED (N-1-naphtylethylenediamine) 0,2%]. Após 10 minutos, a leitura das placas era feita em espectrofotômetro (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão era feita com nitrito diluído no meio de cultura das células nas concentrações de 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM, 3,12µM, 1,56µM e 0µM. Metodologia adaptada da técnica de Green et al, 1981.

Curva de crescimento *in vitro* das leishmânias recuperadas dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção *in vitro* com os parasitos

Macrófagos peritoneais (2×10^5), obtidos como descrito anteriormente, eram distribuídos em placas de 24 poços, em 500µl de RPMI incompleto e incubados por 2 horas em câmara úmida, a 37°C em 5% de CO₂ em ar, para permitir a aderência dos macrófagos às lamínulas. Após esse período, os poços eram lavados com 1ml de STF, pH 7,2 a 37°C para a retirada das células que não aderiram. Em seguida, 2×10^6 *Leishmania amazonensis*, em 500µl de RPMI completo a 37°C, eram adicionadas em cada poço e os macrófagos e as leishmânias eram incubados em câmara úmida, a 37°C em 5% a CO₂ em ar por 6 horas. Após esse tempo, os poços eram lavados com 5 ml de STF a 37°C, para retirar os parasitos não interiorizados/ou fortemente aderidos aos macrófagos e, adicionado 500µl de RPMI completo e novamente, a placa era incubada em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 24 horas.

Após 24 horas de incubação, o meio de cultura era trocado adicionando 1 mL de meio Schneider (Sigma) incrementado com 20% de soro fetal bovino e 40µg/ml de gentamicina, pH 6,7 e as placas eram incubadas a 26°C por um período de 10 dias. Este meio com pH baixo mantido a 26°C elimina os macrófagos das culturas e é adequado

para o crescimento das leishmânias. Diariamente era retirada uma alíquota de 20 μ L de cada escavação para quantificar o crescimento das leishmânias recuperadas após a infecção dos macrófagos peritoneais das duas linhagens de camundongos estudadas. A quantificação das leishmânias foi feita em câmara de Neubauer. Esta técnica foi realizada conforme descrito por Khouri et al, 2010.

Número de macrófagos aderidos às lamínulas após 24 h de incubação

Para esclarecer se a infecção com a leishmânia interferia na sobrevivência dos macrófagos, foi calculado o número de macrófagos que permaneciam aderidos à lamínula após 24 h de incubação com os parasitos. Estes testes foram feitos juntamente com o ensaio da taxa de infecção. Os procedimentos para obtenção dos macrófagos aderidos eram os mesmos para determinação da taxa de infecção, como acima descrito.

O número de células aderidas era quantificado em 10% da área da lamínula. Estas técnicas foram adaptadas de Paula, 2003; Muniz-Junqueira et al, 2008 e Alvarez-Rueda et al, 2009.

Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas empregando-se o programa Prism® Software Package (GraphPad, USA, 2005).

Antes da aplicação dos testes estatísticos foi verificada a normalidade ou não e a variância das variáveis das amostras. A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t ou Mann-Whitney. Para comparação de 3 ou mais grupos foram utilizados os testes ANOVA seguido do teste de Student-

Newman-Keuls para comparações múltiplas entre as variáveis para os dados com distribuição normal. Para comparação das amostras que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre as variáveis.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos graficamente como medianas, quartis e extremos.

RESULTADOS

1. ÍNDICE DE INFECÇÃO

1.1 Avaliação *in vitro* da cinética da interiorização das leishmânias pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) nas primeiras 24h de incubação.

Para avaliar a capacidade de interiorização das *Leishmania amazonensis* pelos macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis à infecção quantificamos o índice de infecção, a porcentagem de macrófagos infectados e número de leishmânias interiorizadas após 6h e 24h de incubação dos macrófagos com as leishmânias *in vitro*.

Observamos um aumento na porcentagem de macrófagos participando da interiorização das *L. amazonensis* (44,5) após 24 h de incubação, que foi 1,2 vezes maior quando comparado com as primeiras 6 horas de incubação (36,5) ($p=0,05$, teste t). Porém, tanto o índice de infecção ($p=0,28$, teste de Wilcoxon) quanto o número de leishmânias interiorizadas por macrófago ($p=0,10$, teste de Wilcoxon) permaneceram inalterados após 6 e 24 horas de interação (Figura 2)

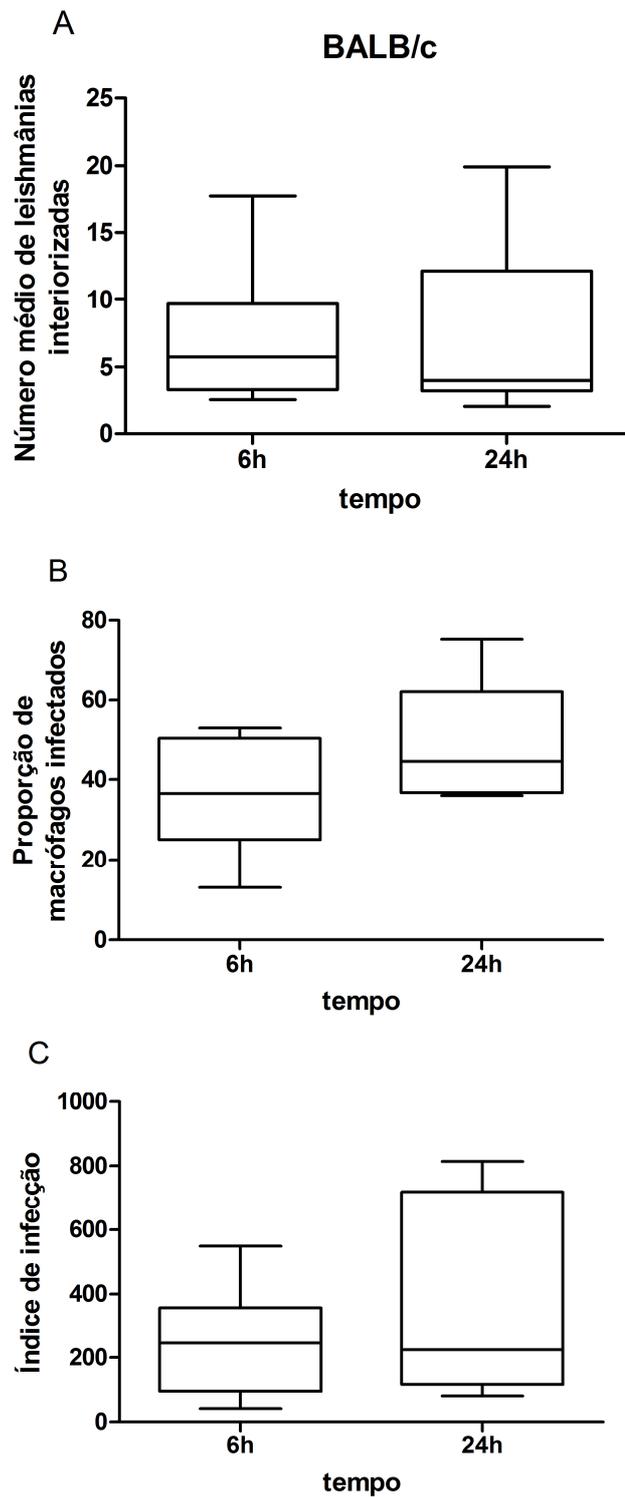


Figura 2: Avaliação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 6h e 24h de incubação. Os resultados foram expressos como medianas, quartis e extremos. **A:** número médio de leishmânias interiorizadas por macrófago após 6h e 24h de infecção; $p=0,10$, teste de Wilcoxon. **B:** Porcentagem de macrófagos infectados, $p=0,05$, teste t. **C:** Índice de infecção dos macrófagos após 6h e 24h de infecção com *L. amazonensis*; $p=0,28$, teste de Wilcoxon.

1.2 Avaliação *in vitro* da cinética da interiorização das leishmânias pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) nas primeiras 24h de incubação.

Para analisar a cinética de interiorização das leishmânias pelos macrófagos peritoneais de camundongos resistentes à infecção utilizamos o mesmo procedimento descrito no tópico anterior.

Semelhante ao observado para os macrófagos dos animais suscetíveis, houve 1,4 vezes mais células participando da fagocitose após 24 horas de incubação (42) do que nas primeiras 6 horas (29,5) ($p=0,03$, teste t pareado). Porém, resposta oposta foi observada para o número de partículas interiorizadas, com diminuição de 5 para 3 leishmânias por macrófago após 24 h ($p= 0,05$, teste de Wilcoxon), fazendo com que não houvesse alteração na resultante final do índice de infecção entre os dois tempos avaliados (116 para 6 h e 154,1 para 24h; $p=0,30$, teste de Wilcoxon). Figura 3.

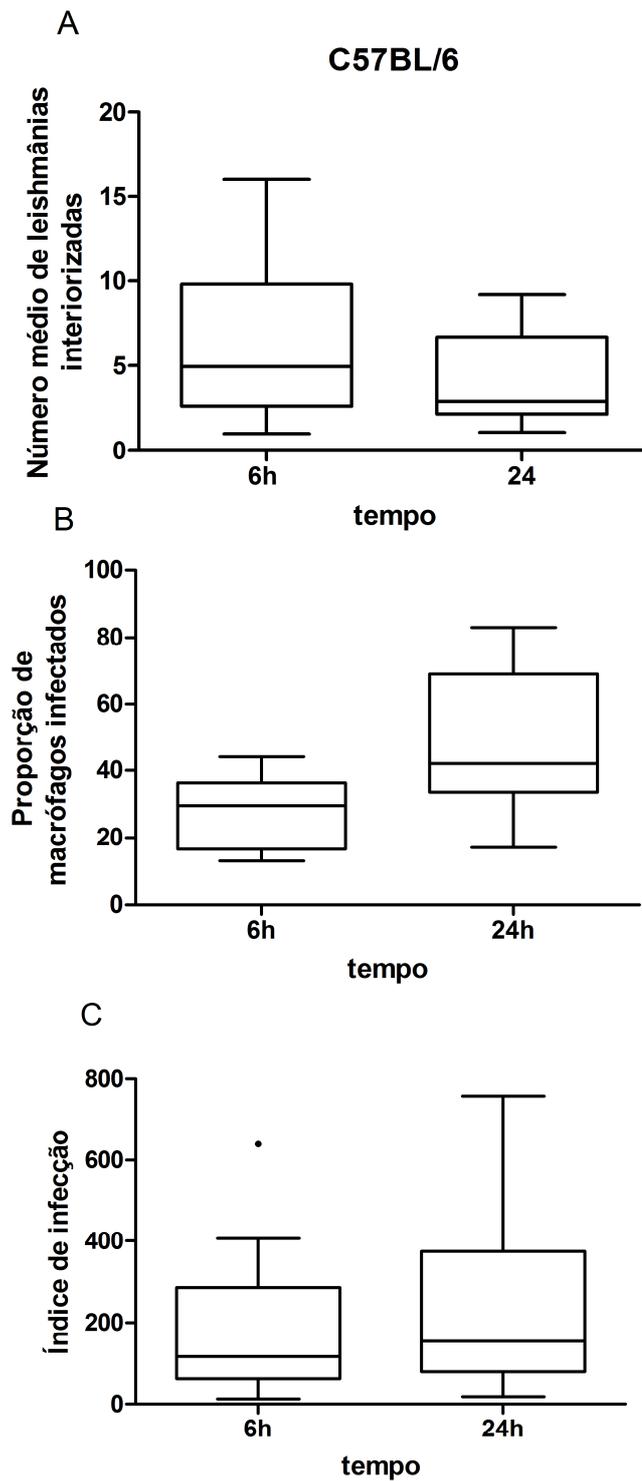


Figura 3: Avaliação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 6h e 24h de incubação. Os resultados foram expressos como medianas, quartis e extremos. A: número médio de leishmânias interiorizadas por macrófago após 6h e 24h de infecção; $p=0,05$, Wilcoxon. B: Porcentagem de macrófagos infectados após 6h e 24h de infecção; $p=0,03$, teste t pareado. C: índice de infecção dos macrófagos após 6h e 24h de infecção com *L. amazonensis*; $p=0,55$, teste de Wilcoxon.

1.3 Comparação entre o índice de infecção *in vitro* dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) e C57BL/6 (resistentes) para *Leishmania amazonensis* nas primeiras 6h de incubação.

Com o objetivo de identificar possíveis diferenças na capacidade de interiorização das leishmânias entre modelos suscetíveis e resistentes, nas primeiras horas de contato, comparamos o índice de infecção dos macrófagos de ambas as linhagens estudadas nas primeiras 6 horas de infecção.

Não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados. O número de parasitos interiorizados pelos macrófagos dos camundongos BALB/c foi de 5,75 enquanto a mediana para os camundongos C57BL/6 foi 5 ($p=0,52$, teste de Mann-Whitney). Para o índice de infecção, as medianas apresentadas foram de 245,3 para BALB/c e 116 para os C57BL/6 ($p=0,39$, teste de Mann-Whitney). Para a porcentagem de macrófagos peritoneais envolvidos na interiorização de *L. amazonensis*, as diferentes linhagens também apresentaram medianas semelhantes, 36,5 para o BALB/c e 29,5 para o C57BL/6 ($p=0,19$, teste t). Figura 4.

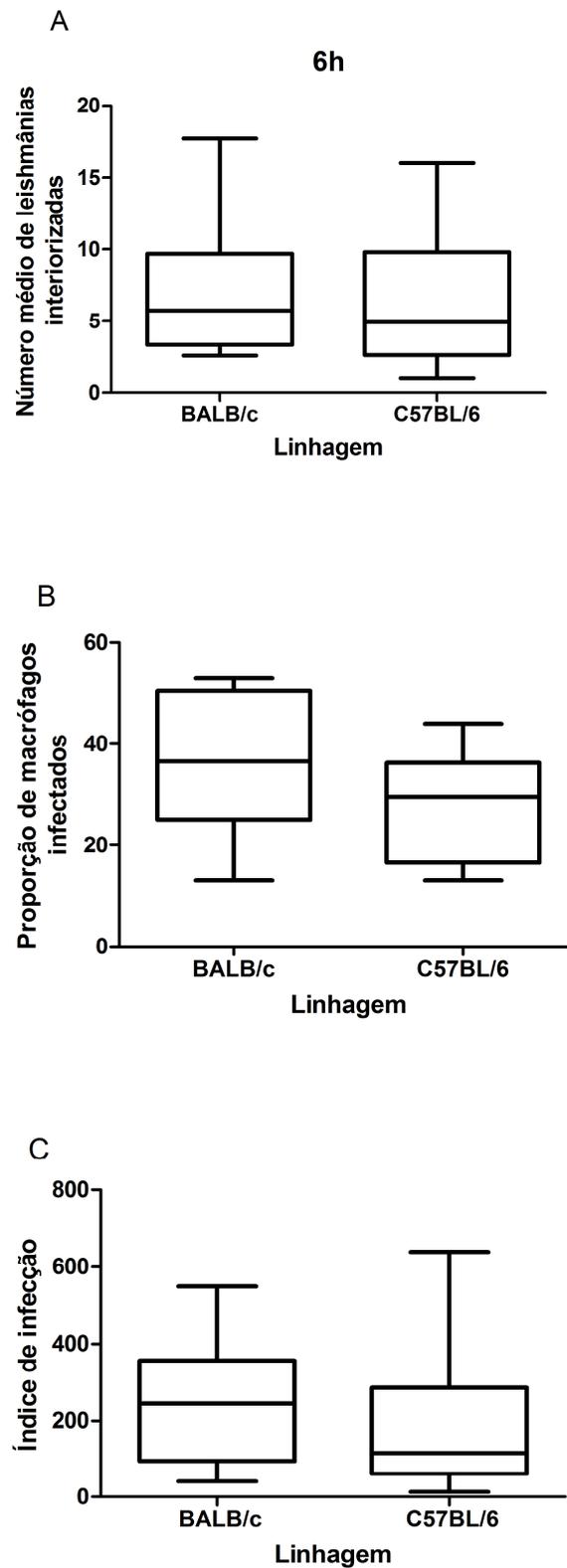


Figura 4: Comparação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 6 h de infecção. Os resultados foram expressos como medianas, quartis e extremos. **A:** número médio de leishmânias interiorizadas por macrófago após 6h de infecção; $p=0,52$, teste de Mann-Whitney. **B:** Porcentagem de macrófagos infectados após 6h de infecção; $p=0,19$, teste de Mann-Whitney. **C:** índice de infecção dos macrófagos após 6h de infecção com *L. amazonensis*; $p=0,39$, teste t.

1.4 Comparação entre o índice de infecção *in vitro* dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) e C57BL/6 (resistentes) para *Leishmania amazonensis* após 24h de incubação.

Não observamos diferença estatística no índice de infecção dos macrófagos dos camundongos suscetíveis ou resistentes pelas leishmânias após 24 h de incubação.

Figura 5.

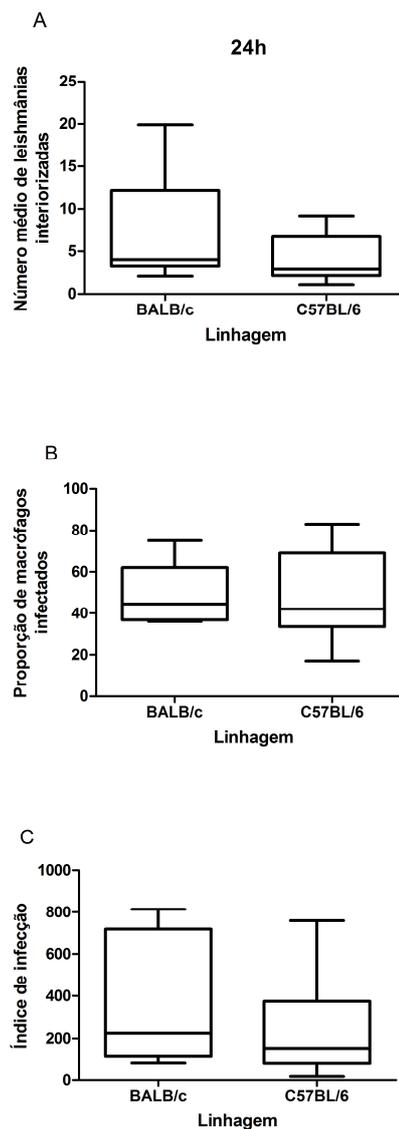


Figura 5: Comparação do índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados *in vitro* com *L. amazonensis* após 24 h de infecção. Os resultados foram expressos como medianas, quartis e extremos. **A:** número médio de leishmânias interiorizadas por macrófago peritoneal de BALB/c e C57BL/6 após 24h de infecção; $p=0,19$, teste de Mann-Whitney. **B:** Porcentagem de macrófagos infectados, $p=0,99$, teste t; **C:** índice de infecção dos macrófagos após 24h de incubação com *L. amazonensis*; $p=0,28$, teste de Mann-Whitney.

2- Curva de crescimento das *Leishmania amazonensis* recuperadas dos macrófagos de camundongos resistentes (C57BL/6) ou suscetíveis (BALB/c) após infecção.

Para avaliar se havia diferença na capacidade microbicida entre os macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6), o crescimento das leishmânias recuperadas dos macrófagos após 24h da interiorização foi avaliado pela quantificação do crescimento das leishmânias em cultura *in vitro* acompanhada por 10 dias.

Observamos um retardo no crescimento das leishmânias recuperadas dos camundongos resistentes à infecção (C57BL/6) em relação às recuperadas dos macrófagos dos animais suscetíveis (BALB/c). Houve também um menor número de leishmânias nas culturas, que foi estatisticamente significante a partir do quarto dia em cultura, sendo as medianas do número de parasitos recuperados/ml de $8,15 \times 10^5$ parasitos/ml para os animais resistentes e de 19×10^7 para os suscetíveis, no quarto dia (teste t, $p=0,01$). Figura 6.

Do quarto ao décimo dia houve um aumento exponencial no número de leishmânias no meio de cultura dos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis, enquanto que no meio onde havia macrófagos peritoneais de camundongos resistentes o aumento foi significativamente menor. Figura 6 e Tabela 2.

Tabela 2: Medianas (extremos) do número de *L. amazonensis* crescendo em cultura *in vitro* após serem recuperadas dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 em cultura por 24h.

Número de <i>L. amazonensis</i> crescendo em cultura <i>in vitro</i> após serem recuperadas dos macrófagos peritoneais			
Medianas (extremos)			
Dia	BALB/c	C57BL/6	p
Primeiro	94411 (0,0-235000) 1,89E+006	22500 (0,0-150000)	0,1474 ns (teste t) 0,1494 ns
Segundo	(0,0- 4,48E+006) 7,41+006	(0,0- 1,87E+006) 57500	(Mann-Whitney) 0,0913 ns
Terceiro	(0,0 - 3,26E+007) 1,92E+007	(0,0 - 1,08E+006) 302500	(Mann-whitney) 0,016 *
Quarto	(362500 - 7,32E+007) 5,53E+007	(5000 - 2,49E+006) 2,18E+006	(Mann-Whitney) 0,0022 **
Quinto	(1,76E+006-9,70+007) 6,23E+007	(766667 - 5,13E+006) 3,40E+006	(Mann-Whitney) <0.0001 ***
Sexto	(1,27E+007-1,2E+008) 7,01E+007	(310000-1,250E+007) 4,81E+006	(Mann-Whitney) 0,0003 ***
Sétimo	(1,88E+007-1,30E+008) 7,46E+007	(585000-3,43E+007) 3,69E+006	(Mann-Whitney) 0,0006 ***
Oitavo	(3,3E+0,007- 1,17E+008) 5,31E+007	(710000-6,65E+007) 4,00E+006	(Mann-Whitney) 0,0274 *
Nono	(3,563E+007-1,19E+008) 3,83E+007	(1,17E+006-7,37E+007) 2,07E+006	(Mann-Whitney) 0,0236 *
Décimo	(4,62E+006 - 6,425+007)	(560000-4,65E+007)	(Mann-Whitney)

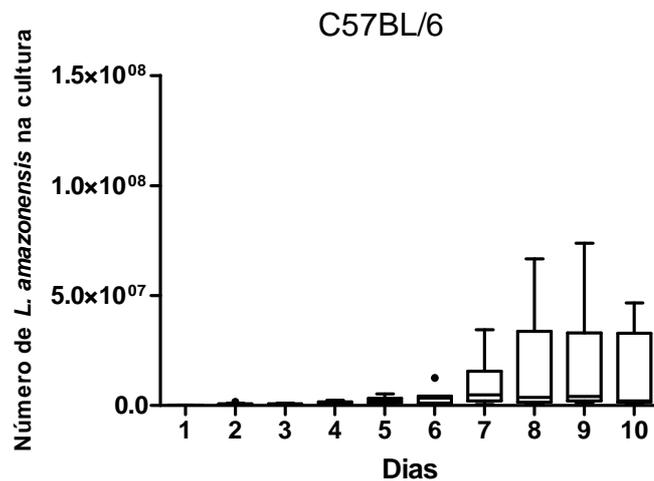
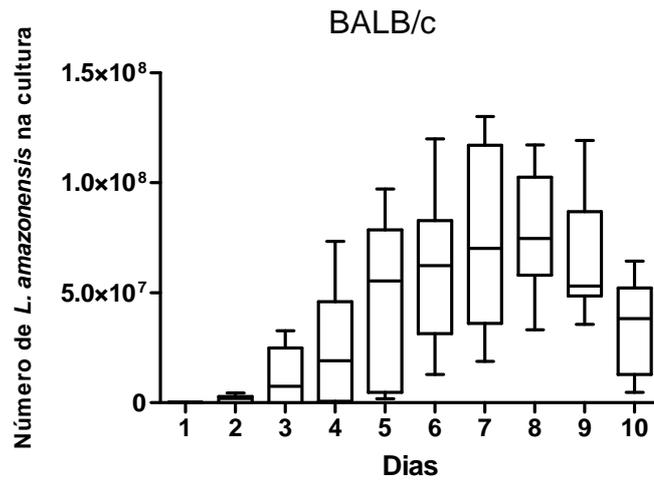


Figura 6: Curva de crescimento de *Leishmania amazonensis* recuperadas de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (BALB/c) após infecção. A partir do 4º dia houve um aumento no crescimento de leishmanias recuperadas de macrófagos de camundongos suscetíveis (BALB/c) muito maior quando comparado com o aumento do crescimento de leishmânias recuperadas dos macrófagos de camundongos resistentes (C57BL/6). Teste t (dia 1) e Mann-Whitney para os outros dias. Valores de p descritos na Tabela 2.

3- TAXA DE ADERÊNCIA

Para verificar se o número de leishmânias crescendo em cultura após serem recuperados dos macrófagos devia-se a um menor número destas células que permaneciam aderidas após 24 h de incubação, quantificamos o número de macrófagos que permaneceram aderidos na lâmina após as 24h em cultura, na presença ou não das leishmânias.

3.1 Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação na presença ou não de *L. amazonensis*.

Não houve diferenças estatísticas na quantidade de macrófagos que permaneceram aderidos às lamínulas quando comparamos os que foram desafiados com as leishmânias e os que não foram desafiados após 24h em cultura para os macrófagos dos camundongos BALB/c (Teste t, $p=0,27$). Figura 7.

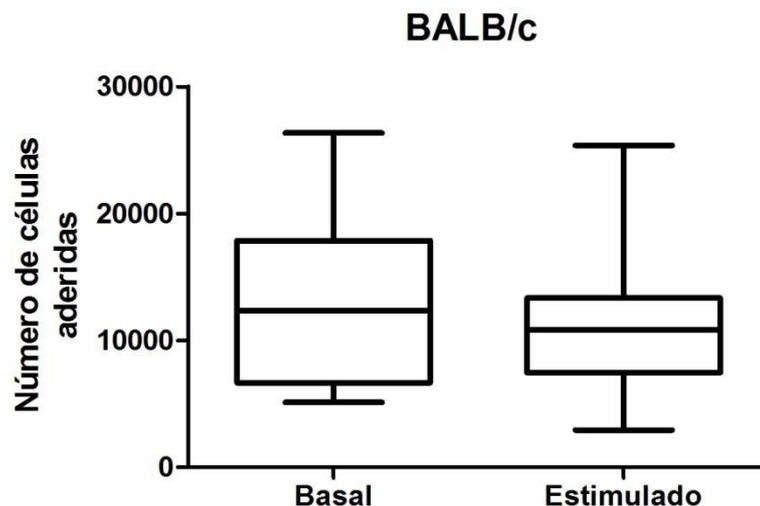


Figura 7: Comparação entre quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não pela *L. amazonensis* que permaneceram aderidos à lamínula após 24 h de incubação. Teste t, $p=0,27$.

3.2 Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação na presença ou não de *L. amazonensis*.

Para os camundongos resistentes (C57BL/6), a mediana da quantidade de macrófagos aderidos à lamínula que não foram desafiadas com a leishmânia foi significativamente maior do que a mediana da contagem daqueles macrófagos que foram infectados com o parasito ($p=0,01$, teste t). Figura 8.

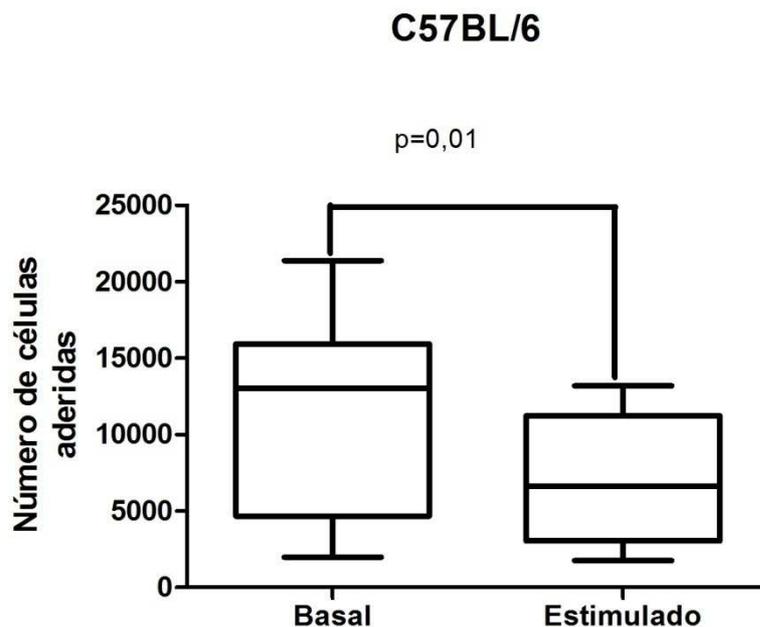


Figura 8: Comparação entre quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 aderidos à lamínulas infectados ou não pela *L. amazonensis*. Teste t, $p=0,01$.

3.3 Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetíveis) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação sem *L. amazonensis*.

Para saber se havia diferenças na quantidade basal (na ausência de leishmânias) de macrófagos que permaneceram aderidos à lamínula após 24h entre as linhagens, comparamos a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 aderidos, que tinham permanecido em cultura, mas na ausência de leishmânias. Não houve diferenças estatísticas no quantitativo de macrófagos aderidos obtidos de camundongos BALB/c ou dos camundongos C57BL/6 ($p=0,63$; Teste t).

Figura 9.

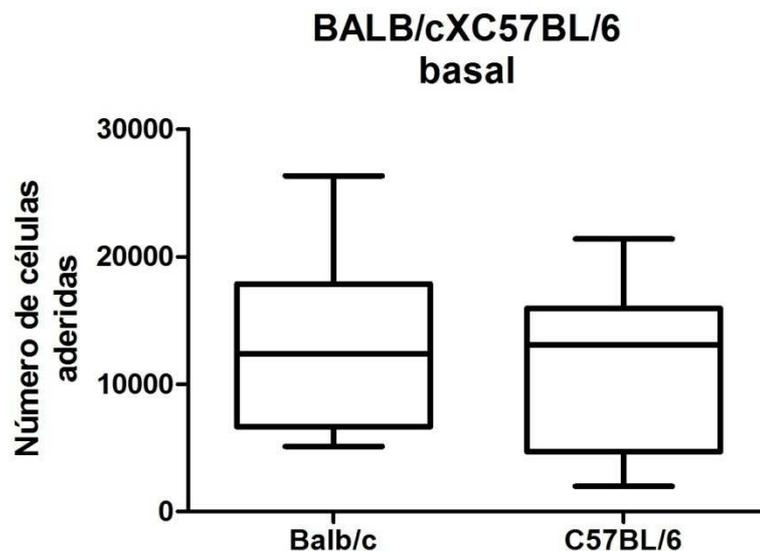


Figura 9: Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetível) aderidos após 24 h de incubação, na ausência das *L. amazonensis*. Teste t, $p=0,63$.

3.4 Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetíveis) aderidos à lamínula após 24 horas de incubação com *L. amazonensis*.

Não houve diferença significativa no quantitativo de células aderidas entre macrófagos peritoneais de camundongos resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (BALB/c) quando infectados com leishmânias ($p=0,14$, teste t). Figura 10.

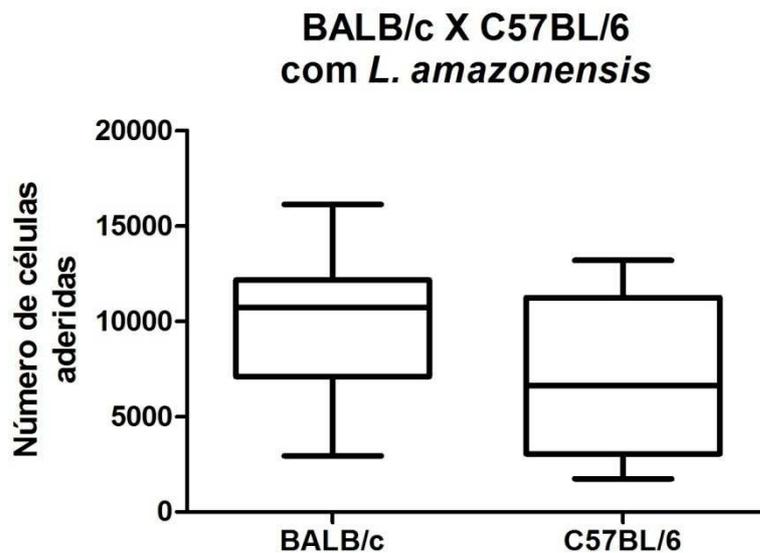


Figura 10: Comparação entre a quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetível) aderidos à lamínula após 24 h de incubação com *L. amazonensis*. Teste t, $p=0,14$.

4- ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico foi determinado para estimar a capacidade de produção de moléculas microbidas pelos macrófagos dos dois modelos estudados.

4.1 Caracterização da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c em 24 h.

Nas primeiras 24 h de incubação dos macrófagos em meio de cultura observamos um aumento gradual, estatisticamente significativo, da produção do NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, sendo a mediana de $1,33\mu\text{M}$ na primeira hora, de $2,14\mu\text{M}$, após 6 h de incubação e de $2,02\mu\text{M}$, com 24 h ($p<0,05$; teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparações múltiplas, $6h>1h$; $24h>1h$) (Figura 11).

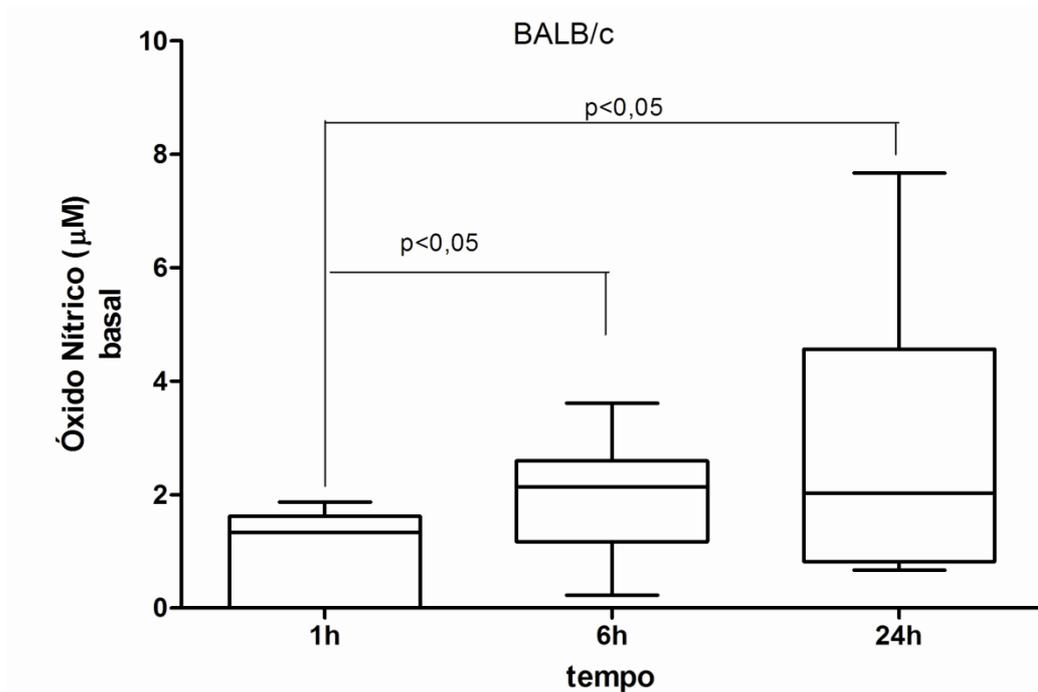


Figura 11. Cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) em 24 h. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos suscetíveis BALB/c foram incubadas na ausência de leishmânia por 1h, 6h e 24h. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando o reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,003$ seguido pelo método de Dunn para comparações múltiplas 24h e 6h > 1h ($p<0,05$).

4.2 Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Quando as *Leishmania amazonensis* foram colocadas na cultura, houve aumento da produção do NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis nas primeiras 6 horas de incubação. Entretanto, houve normalização da produção do NO após 24 horas de incubação na presença do parasito. Os valores das medianas para os tempos analisados foram de 0,87 µM na primeira hora, 2,0 µM no tempo de 6 horas e em 24 horas 1,11 µM ($p<0,05$; ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls; 1h <6h>24h) (figura 12).

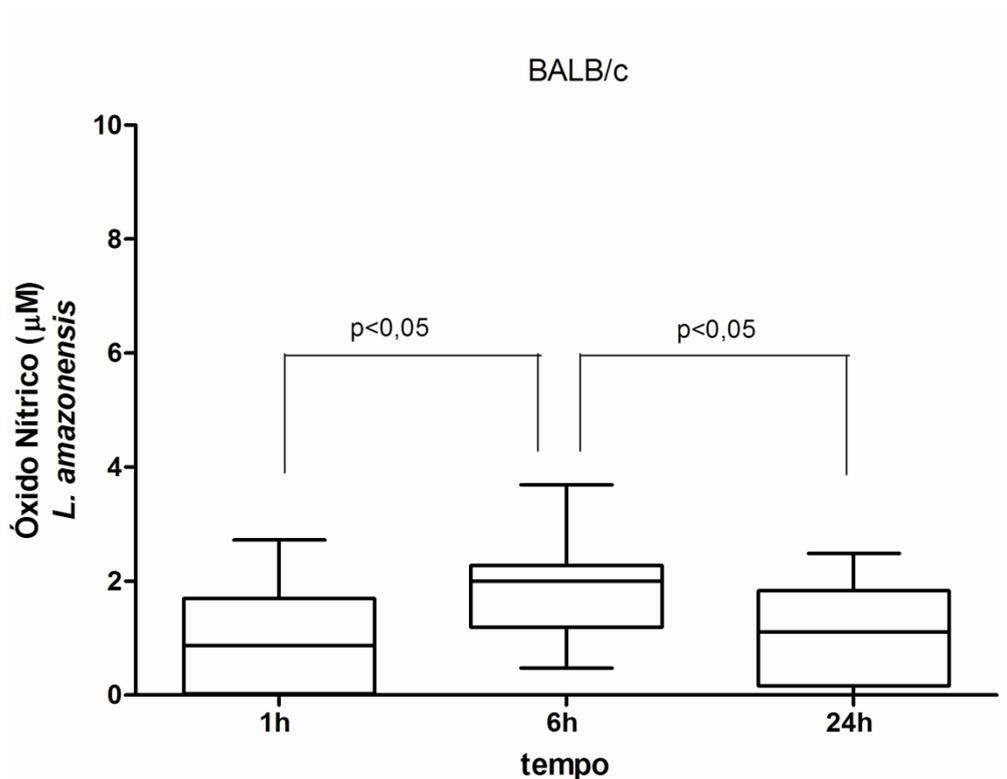


Figura 12: Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Macrófagos peritoneais de 14 camundongos suscetíveis BALB/c foram incubados na presença de leishmânia por 1h, 6h e 24h. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando o reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. ANOVA, $p=0,027$, seguido do teste de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações, $p < 0,05$ entre 1<6>24 horas ($p < 0,05$).

4.3 Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pela *L. amazonensis* pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Comparando-se as medianas da produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis infectados *in vitro* ou não com *Leishmania amazonensis*, observamos que até 6 h não houve diferença entre a produção basal e estimulada pela leishmânia, mas que após 24 horas de incubação, os macrófagos infectados não conseguiram manter a produção do NO, produzindo menos NO do que os macrófagos não infectados no mesmo tempo, sendo as medianas de 1,1 μM e 2,27 μM para infectados ou não, respectivamente ($p=0,02$; teste t) (Figura 13).

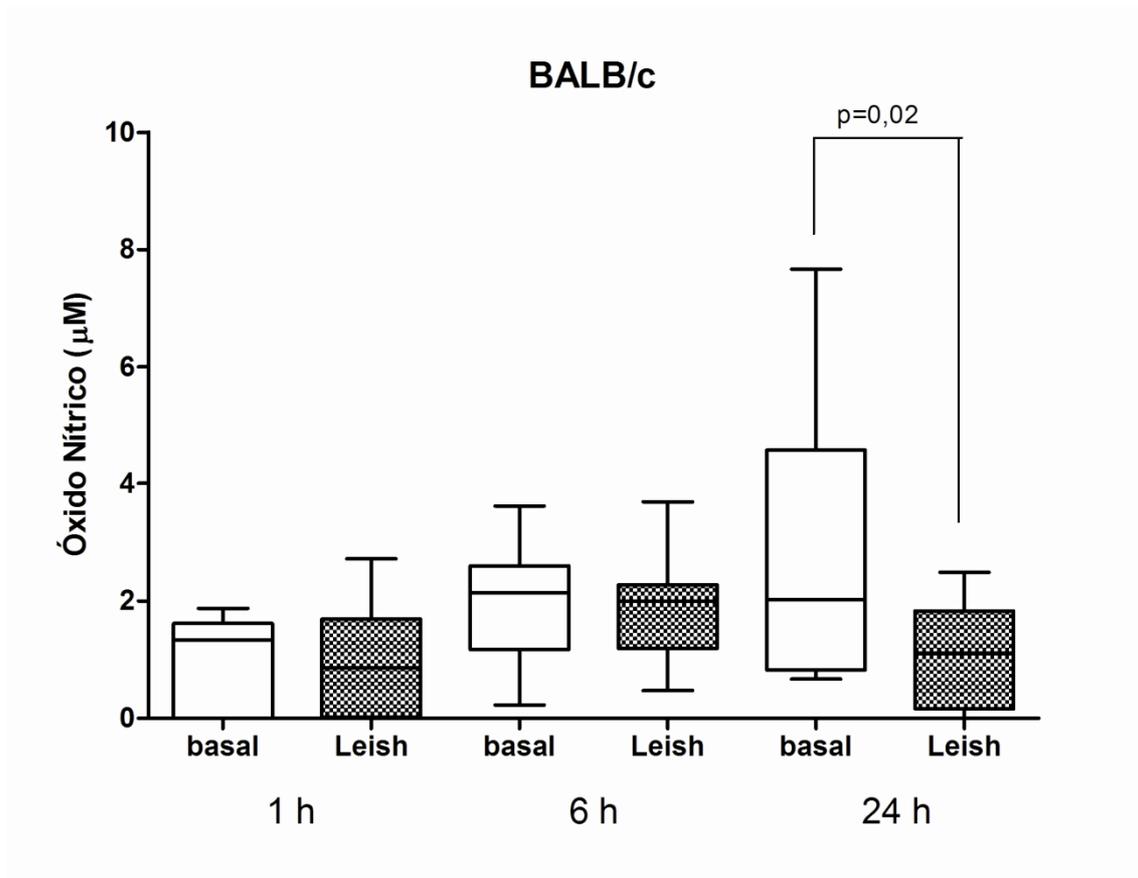


Figura 13: Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pelos macrófagos peritoneais infectados ou não com *Leishmania amazonensis*. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos susceptíveis BALB/c foram incubados na presença ou não de leishmânia. O óxido nítrico foi dosado pela presença de nitrito no sobrenadante utilizando solução de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. Teste t, $p=0,02$.

4.4 Caracterização da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em 24 h.

Observamos um aumento gradativo nas primeiras 24 h de incubação da produção basal de NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos resistentes C57BL/6. Porém, o aumento só foi estatisticamente significativo no tempo de 24 horas, sendo a mediana da produção do NO de 1,17 µM na primeira hora e de 2,01 µM após 24 h ($p=0,03$), ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls, $24h>1h$; $p>0,05$) (Figura 14).

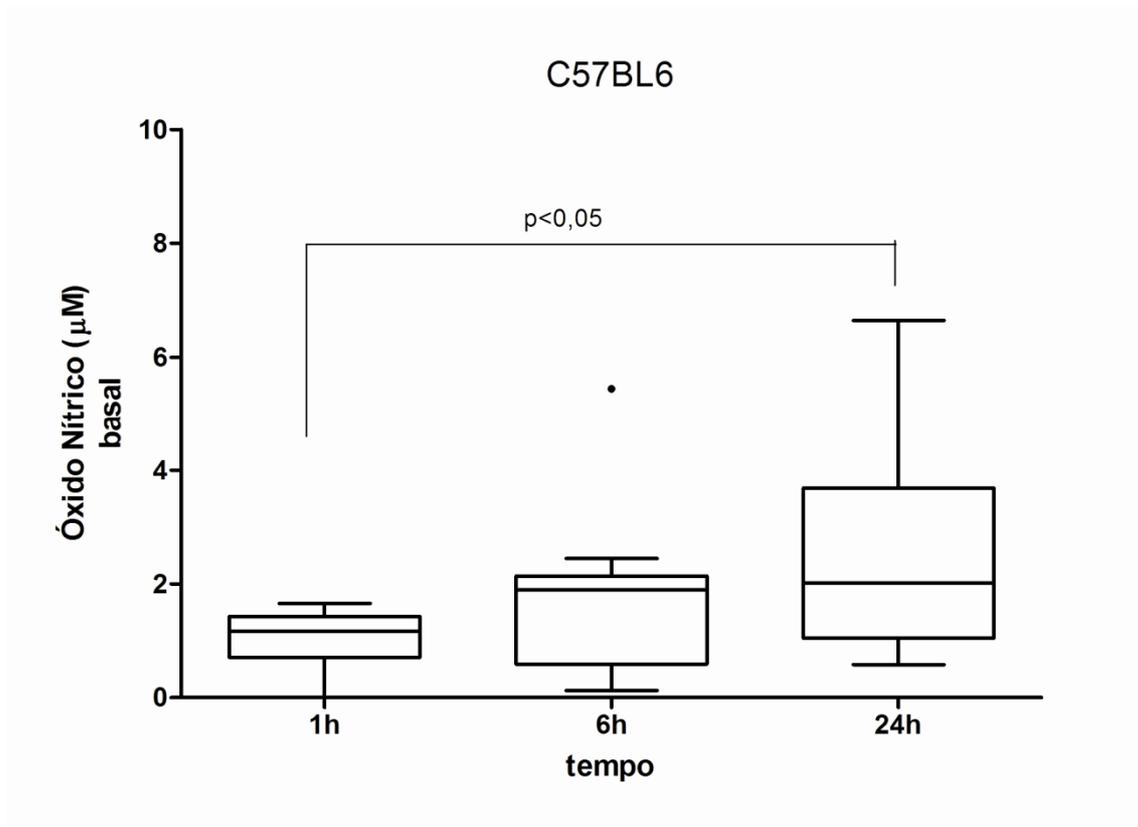


Figura 14: Cinética de produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 em 24 h. Os macrófagos peritoneais de 13 camundongos resistentes C57BL/6 foram incubados na ausência de leishmânia por 1h, 6h e 24h. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando o reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. ANOVA, $P=0,03$, seguido pelo teste Student Newman-Keuls para múltiplas comparações. $24\text{ h} > 1\text{ h}$ ($p=0,05$).

4.5 Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

Na presença de *Leishmania amazonensis*, os macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 resistentes apresentaram um aumento gradativo na produção do NO em 24 horas de incubação. A mediana da produção do NO na primeira hora foi de $0,72\ \mu\text{M}$, na sexta hora, $1,01\ \mu\text{M}$ e em 24 horas, de $1,82\ \mu\text{M}$ ($p=0,032$), Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls, $24\text{ h} > 1\text{ h}$ e 6 h) (Figura 15).

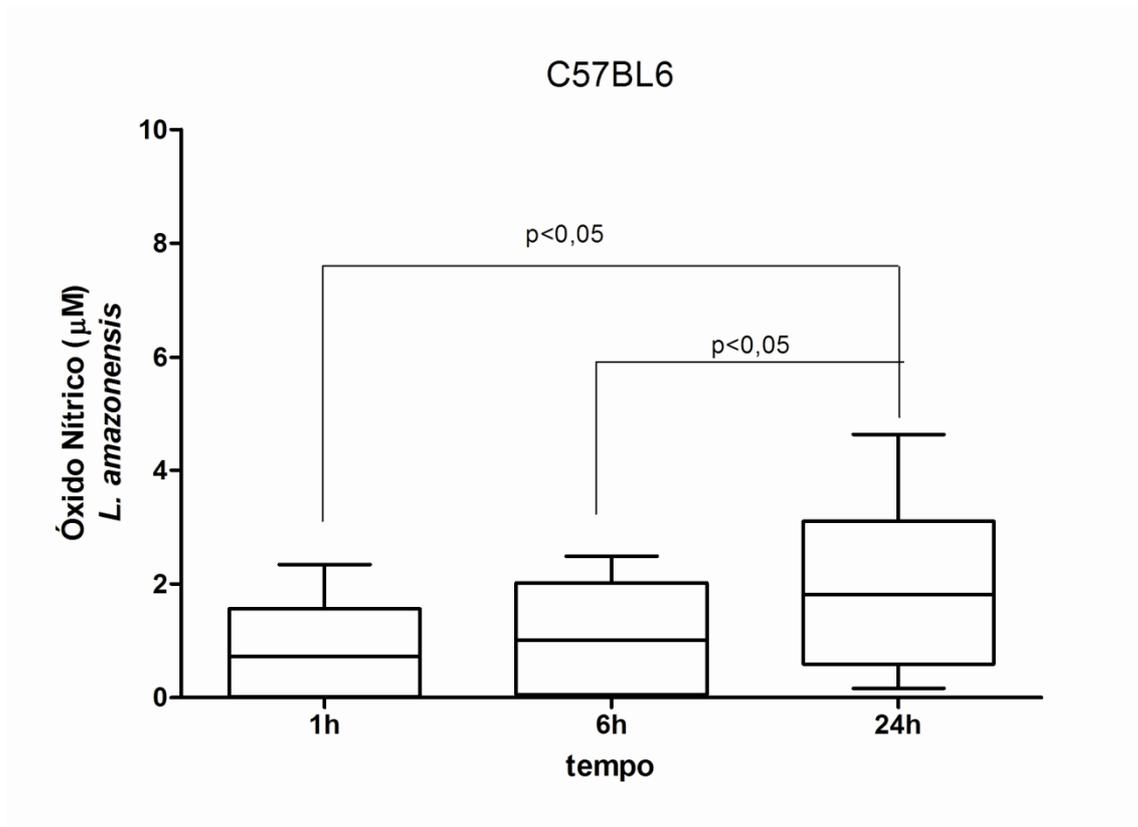


Figura 15: Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na cinética de produção do óxido nítrico em 24h pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. Os macrófagos peritoneais de 13 camundongos resistentes C57BL/6 foram incubados na presença de leishmânia por 1h, 6h e 24h. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando o reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. ANOVA, $p=0,032$, seguido pelo teste de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações, $p=0,03$, $24\text{ h} > 1\text{ h}$ e 6 h ; ($p < 0,05$).

4.6 Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pela *L. amazonensis* pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6

Não houve alteração significativa na produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 na presença ou ausência da *L. amazonensis*, nas primeiras 24 h em cultura ($p > 0,05$, teste t) (Figura 16).

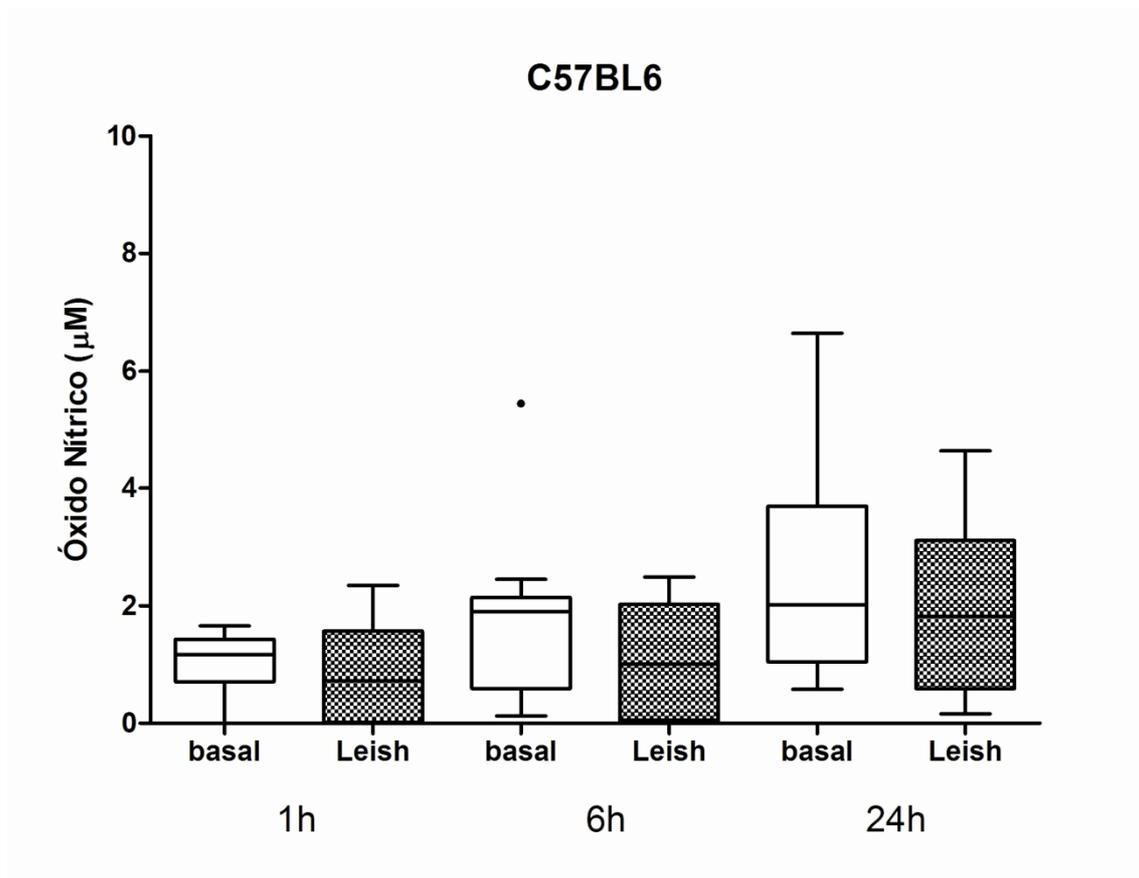


Figura 16: Comparação entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados ou não com *L. amazonensis*. Os macrófagos peritoneais de 13 camundongos resistentes C57BL/6 foram incubados na presença ou não de leishmânia. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. Teste t, $p > 0,05$.

4.7 Comparação da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais entre os camundongos BALB/c e C57BL/6 nas primeiras 24 h.

Não houve diferença na cinética da produção basal do NO nas primeiras 24 h de incubação pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis BALB/c (1h=1,33 µM; 6h=2,14 µM e 24h=2,02 µM) em relação aos camundongos resistentes C57BL/6 (1h=1,17 µM; 6h=1,89 e 24h=2,01 µM). Houve aumento gradativo semelhante na produção basal do NO pelos macrófagos peritoneais dos dois modelos de camundongos para infecção pela leishmânia ($p > 0,05$; teste t). Figura 17.

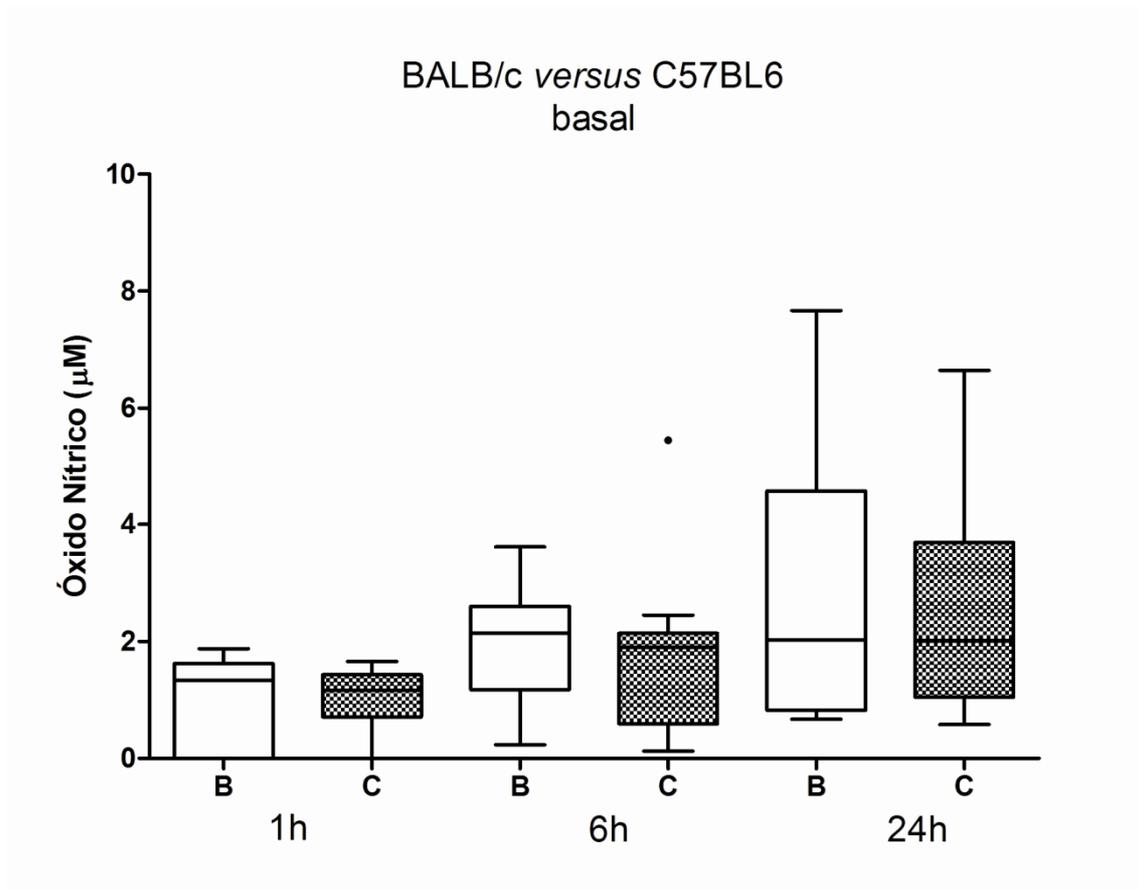


Figura 17: Comparação da cinética da produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 24 h. Os macrófagos peritoneais de 13 camundongos resistentes C57BL/6 e suscetíveis BALB/c foram incubadas na ausência de leishmânia. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. B= BALB/c e C= C57BL/6. Teste t, $p > 0,05$ para todos os tempos.

4.8 Comparação da cinética de produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais estimulados pela *L. amazonensis* entre camundongos BALB/c e C57BL/6 em 24 h.

Observamos que os camundongos suscetíveis BALB/c ($2 \mu\text{M}$) aumentaram a produção do NO mais precocemente do que os camundongos resistentes C57BL/6 ($1 \mu\text{M}$), sendo a diferença já detectada com 6h, ($p=0,03$, teste t). Entretanto, diferentemente da resposta dos camundongos resistentes C57BL/6, que aumentam progressivamente a produção do NO nas primeiras 24h, os camundongos suscetíveis

BALB/c, não sustentaram a produção do NO após esse período de incubação *in vitro* com as leishmânias, apresentando concentração menor de NO do que os macrófagos dos camundongos C57BL/6 no mesmo período (1,1 μM para BALB/c após 24h *versus* 1,82 μM para C57BL/6 após 24h) Teste t, $p=0,04$. Figura 18.

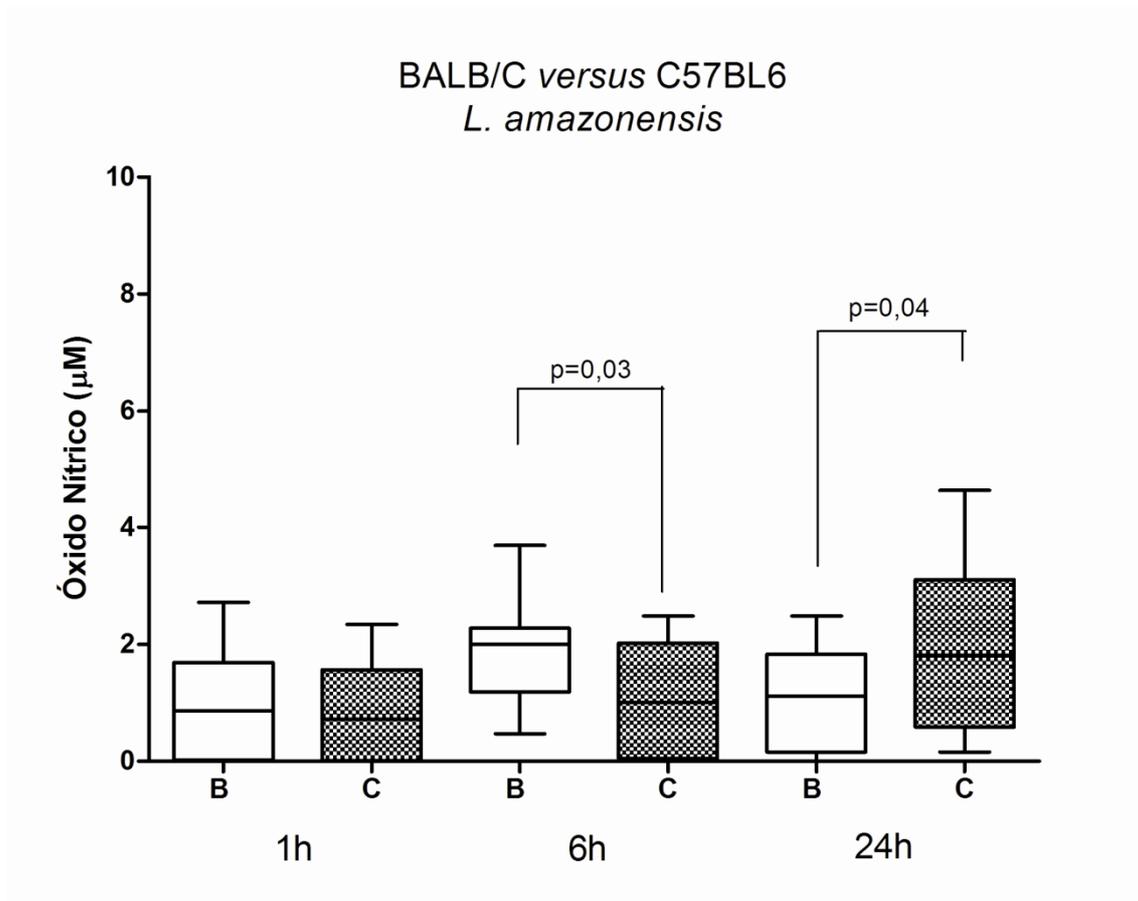


Figura 18: Comparação da cinética de produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados pela *L. amazonensis*. Os macrófagos peritoneais de 13 camundongos resistentes C57BL/6 ou suscetíveis BALB/c foram incubadas na presença de leishmânia. O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando reagente de Griess. Os dados foram expressos como medianas, quartis e extremos. B= BALB/c e C= C57BL/6. Teste t , $p=0,03$ para o tempo de 6 horas e $p=0,04$ para o tempo de 24 horas.

5- PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio foi determinado para estimar a capacidade de produção de moléculas microbicidas pelos macrófagos dos dois modelos estudados.

5.1 Cinética de produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, nas primeiras 24 horas.

Não houve diferença na produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c, que são suscetíveis à infecção pela leishmânia, nas primeiras 24 h de incubação ($p=0,31$ pelo teste de ANOVA). Figura 19.

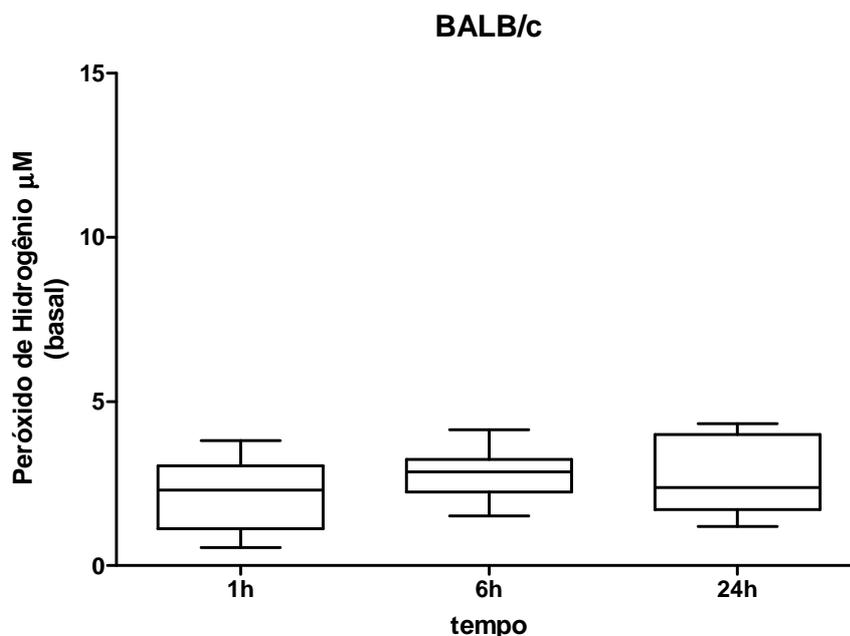


Figura 19: Cinética de produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, suscetíveis à *Leishmania amazonensis*. Macrófagos peritoneais de 14 camundongos suscetíveis foram incubados na ausência de leishmânia por 1h, 6h e 24h e a produção do peróxido de hidrogênio foi determinada em cultura pela oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. ANOVA, $p=0,31$.

5.2 Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, nas primeiras 24h de incubação.

Quando os macrófagos peritoneais foram desafiados com a *Leishmania amazonensis*, *in vitro*, houve um aumento significativo na produção de peróxido de hidrogênio após 6 horas de incubação. Sendo que a mediana aumentou de 2,97 μM $\text{H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^4$ macrófagos peritoneais/h na primeira hora para 3,62 μM $\text{H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^4$ macrófagos peritoneais/h após 6 h de incubação ($p=0,007$, pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn). Não modificando até 24 horas de incubação (3,56 μM $\text{H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^4$ macrófagos peritoneais/h). Figura 10.

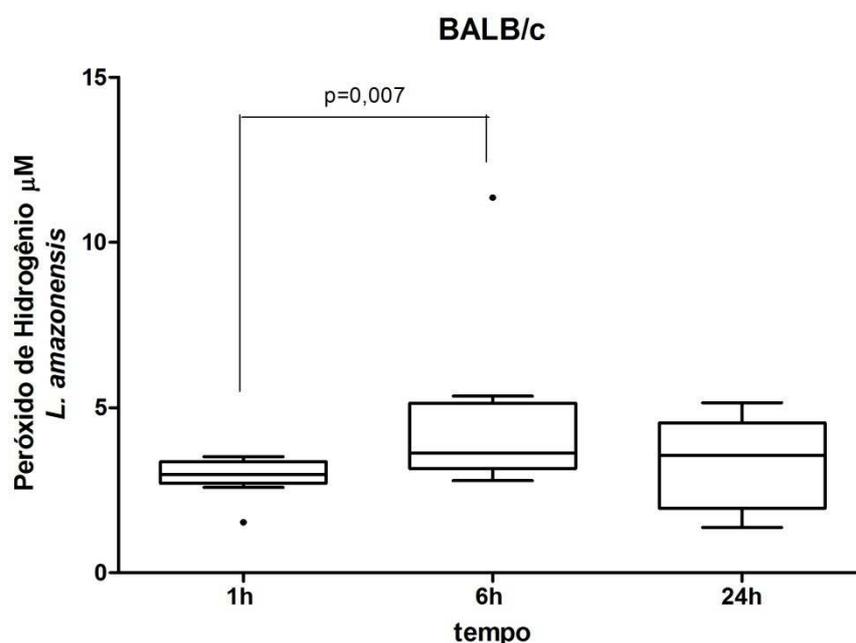


Figura 20: Influência da infecção por *L. amazonensis* na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos suscetíveis foram incubados na presença de leishmânia por 1h, 6h e 24h e a produção de peróxido de hidrogênio foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol no sobrenadante das culturas na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, $p=0,007$, 6 h>1h.

5.3 Comparação entre a cinética de produção de peróxido de hidrogênio basal e estimulada pela *L. amazonensis*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C durante as primeiras 24h de incubação.

A cinética da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos camundongos BALB/c durante 24 h foi diferente se as células foram desafiadas pela leishmânia ou não. Não observamos alteração na produção basal do H₂O₂ com o tempo, mas os macrófagos dos animais desafiados *in vitro* com a *L. amazonensis* produziram mais peróxido de hidrogênio do que os animais não desafiados, no tempo de 6h (2,85 μM H₂O₂/1.5x10⁴ macrófagos peritoneais/h para os macrófagos peritoneais não infectados com o parasito e 3,62 μM H₂O₂/1.5x10⁴ macrófagos peritoneais/h para os macrófagos infectados há 6 h) (p= 0,004, teste de Mann-Whitney). Figura 21.

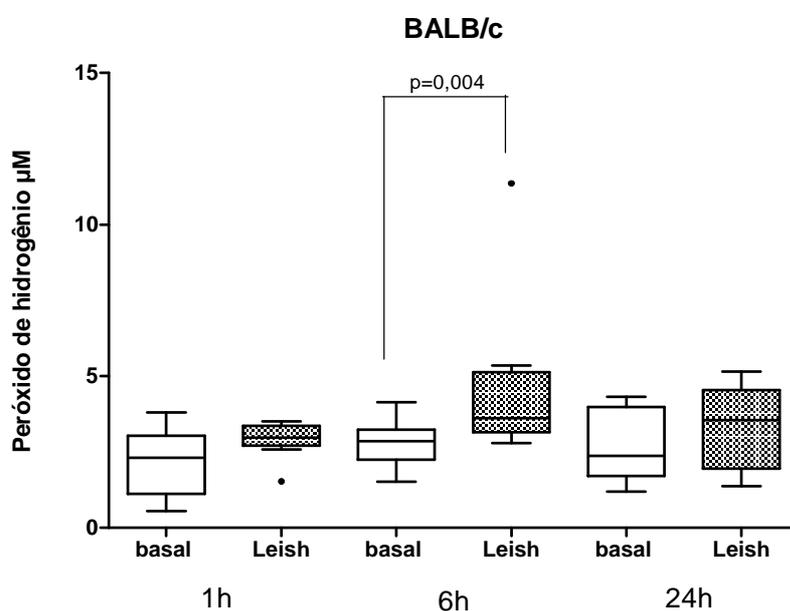


Figura 21: Comparação da cinética da produção basal de peróxido de hidrogênio e da estimulada pela *L. amazonensis*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C durante as primeiras 24h de incubação. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos susceptíveis incubados na presença ou ausência de leishmânia por 1h, 6h e 24h. O peróxido de hidrogênio foi determinado pela oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste de Mann-Whitney, p=0,004, Leish > basal após 6 horas de incubação.

5.4 Cinética da produção basal de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 nas primeiras 24 horas.

Não houve diferença na produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, resistentes à *L. amazonensis*, nas primeiras 24 horas de incubação *in vitro* ($p=0,70$; teste Kruskal-Wallis). Figura 22.

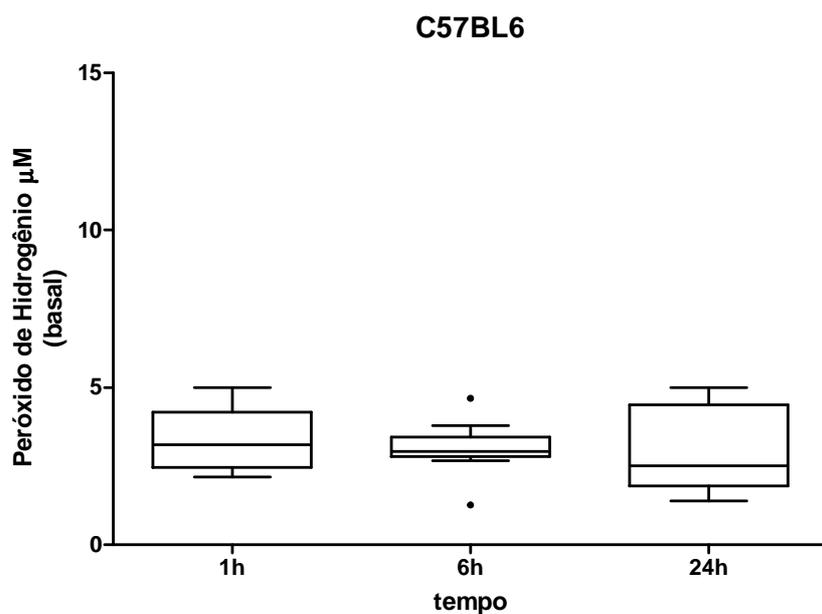


Figura 22: Cinética da produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, resistentes à infecção por *Leishmania amazonensis*. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos resistentes C57BL/6 foram incubados na ausência leishmânia por 1h, 6h e 24h e a produção de peróxido de hidrogênio foi determinado por oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,70$.

5.5 Influência da infecção pela *Leishmania amazonensis* na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, nas primeiras 24h de incubação.

O desafio dos macrófagos *in vitro* com as leishmânias não modificou a produção do peróxido de hidrogênio nas primeiras 24h em cultura nos animais naturalmente resistentes ao parasito ($p=0,72$; teste de Kruskal-Wallis). Figura 23.

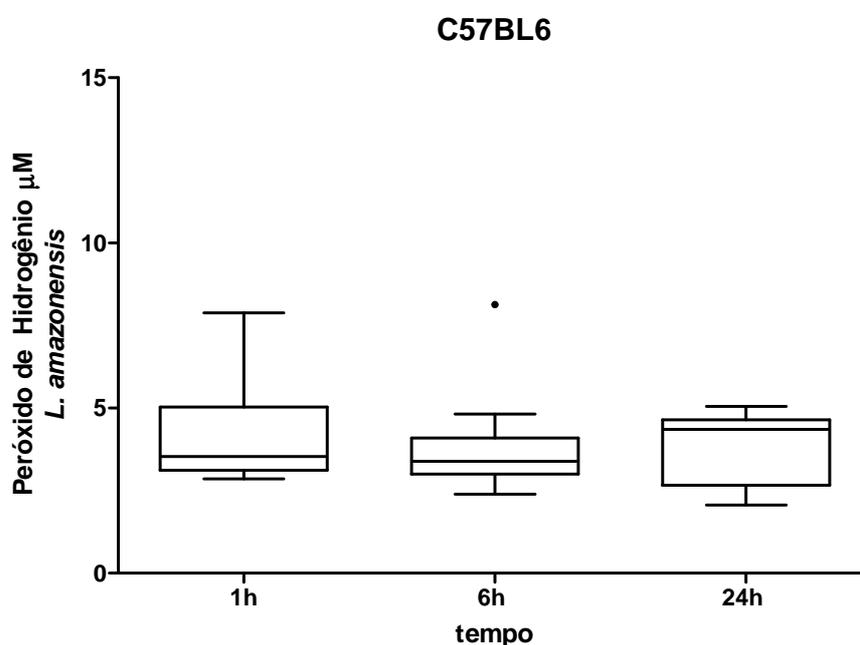


Figura 23: Influência da infecção pela *L. amazonensis* na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos resistentes C57BL/6 foram incubados na presença leishmânia por 1h, 6h e 24h e o peróxido de hidrogênio foi determinado por oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,72$).

5.6 Comparação entre a cinética da produção basal e da estimulada pela *L. amazonensis* de peróxido de hidrogênio, pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 durante as primeiras 24h de incubação.

Não houve diferença na cinética da produção de peróxido de hidrogênio na ausência ou na presença da *Leishmania amazonensis* pelos macrófagos dos camundongos C57BL/6, que são naturalmente resistentes à infecção ($p > 0,05$, teste t para 1 h, e Mann-Whitney para 6 e 24h). Figura 24.

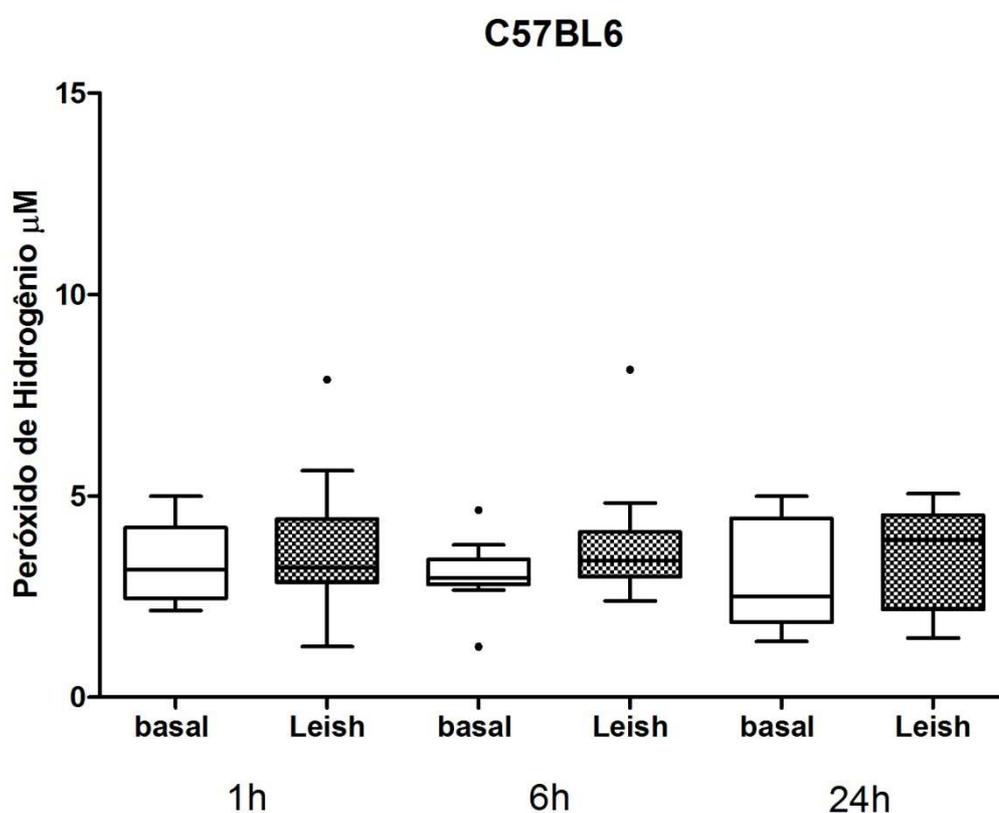


Figura 24. Comparação da cinética da produção basal e estimulada de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados pela *Leishmania amazonensis in vitro*. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos resistentes foram incubados na presença ou ausência leishmânia por 1h, 6h e 24h de incubação e o peróxido de hidrogênio foi determinado por oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste t em 1h e Mann-Whitney em 6h e 24h).

5.7 Comparação da produção basal de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais entre camundongos BALB/c e C57BL/6 em 24 horas.

Com o intuito de identificar possíveis diferenças na produção de peróxido de hidrogênio entre os modelos susceptível e resistente à infecção pela leishmânia, comparamos a produção basal deste radical pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 e BALB/c durante 24h em cultura. Observamos que há uma maior produção do radical desde a primeira hora pelos macrófagos dos animais resistentes (C57BL/6) ($p=0,01$, teste t). Observamos que os macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 possuem um nível basal mais elevado de peróxido de hidrogênio do que os camundongos BALB/c, pois ao longo do tempo, não houve decaimento da concentração pelos macrófagos dos camundongos resistentes e nem aumento da concentração pelos macrófagos dos camundongos BALB/c ($p=0,01$, teste t). Figura 25.

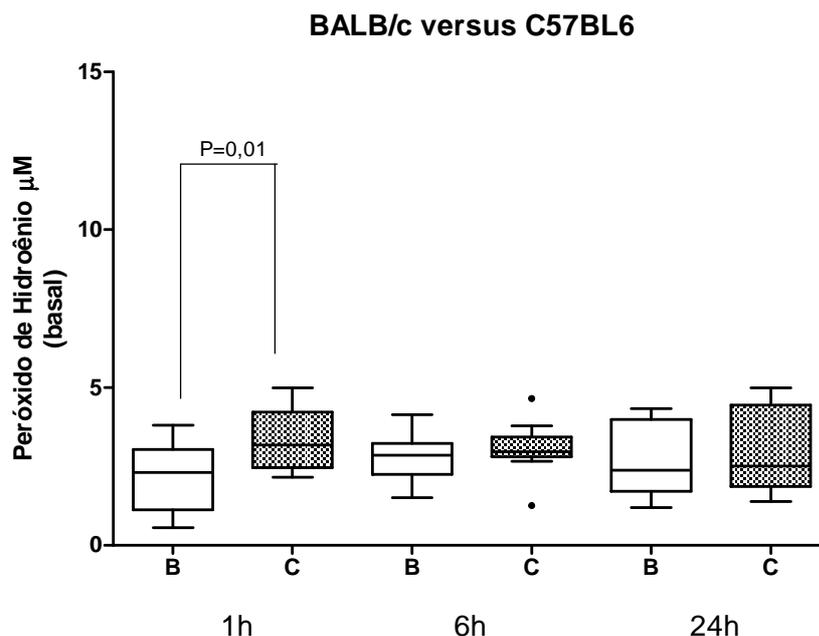


Figura 25: Comparação da produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (B) e C57BL/6 (C) por 24 h. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos resistentes C57BL/6 e suscetíveis BALB/c foram incubados na ausência leishmânia por 1h, 6h e 24h. O peróxido de hidrogênio foi determinado por oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste t, $p=0,01$, $C>B$ em 1h. Concentração expressa em μM . B=BALB/c e C= C57BL/6

5.8 Comparação da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais estimulados pela *Leishmania amazonensis* entre camundongos BALB/c e C57BL/6, nas primeiras 24 h de incubação.

Após o desafio com a *Leishmania amazonensis*, a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos resistentes ou suscetíveis apresentou perfil semelhante ao observado quando avaliamos a produção basal deste radical livre. Após a primeira hora de incubação com o parasito, a mediana de produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos resistentes (C57BL/6) foi ($3,53\mu\text{M}$), significativamente maior do que a mediana da produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos camundongos BALB/c suscetíveis à

infecção (2,97 μ M) ($p=0,04$, teste t). As diferenças não foram estatisticamente significante nos demais tempos (teste Mann-Whitney). Figura 26.

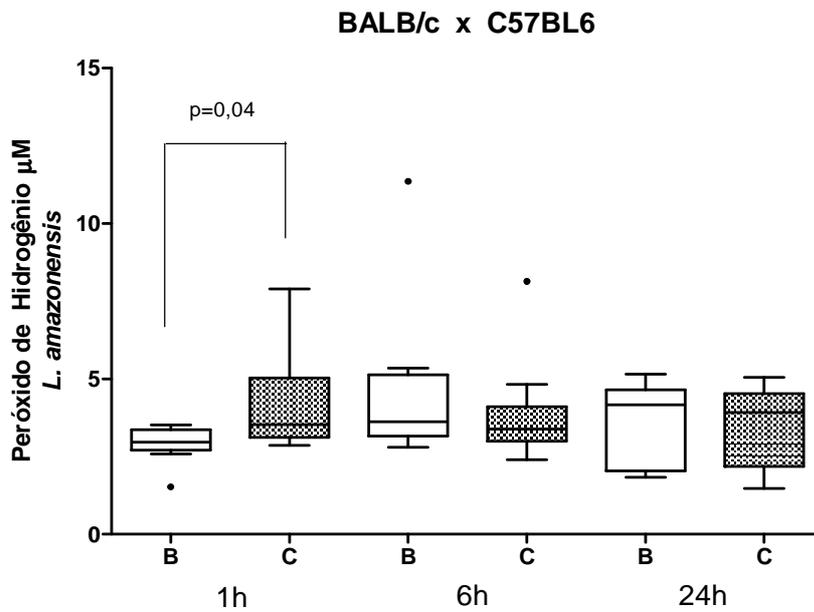


Figura 26: Comparação da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulada pela *Leishmania amazonensis* nas primeiras 24 h de incubação. Os macrófagos peritoneais de 14 camundongos resistentes C57BL/6 e suscetíveis BALB/c foram incubados na presença de leishmânia por 1h, 6h e 24h. O peróxido de hidrogênio foi determinado pela oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. Os dados foram expressos como mediana, quartis e extremos. Teste t, $p=0,04$, $B>C$ em 1h. B= BALB/c e C= C57BL/6.

DISCUSSÃO

A imunidade inata possui um papel fundamental na leishmaniose, pois é a primeira linha de defesa do sistema imunitário contra patógenos (Akira et al, 2006; Turvey and Broide, 2010). Na infecção pela leishmânia, os eventos iniciais que ocorrem imediatamente após a transmissão de promastigotas pelo inseto vetor ainda estão pouco elucidados, são cruciais no estabelecimento da infecção e envolvem a participação do sistema do complemento, neutrófilos, células NK, macrófagos e fatores de crescimento. São esses elementos, entre outros, que formam uma barreira à infecção, dificultando a sua instalação, e que, ao mesmo tempo, durante o processo constituem-se em elementos que auxiliam a evasão do parasito da resposta protetora do hospedeiro (Goto, 2004).

Neste trabalho, foi avaliada a resposta imunitária inata de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, que são naturalmente suscetíveis e camundongos C57BL/6, que são naturalmente resistentes à infecção pela leishmânia, pelo estudo das funções dos macrófagos infectados *in vitro* com a *Leishmania amazonensis*.

É por meio da fagocitose que células fagocíticas do sistema imunitário eliminam os patógenos invasores, sendo esse mecanismo fundamental para o estabelecimento da resposta imunitária. Os receptores presentes na membrana dos fagócitos (Stuart and Ezekowitz, 2005) reconhecem partículas estranhas, e esses receptores internalizam essas partículas e ativam os mecanismos microbicidas fagossomal, adquirindo peptídeos para a ativação da resposta imunitária adaptativa e inflamação (Underhill, 2005).

Após a ligação com receptores na superfície do fagócito, a partícula é interiorizada formando um fagossoma, ocorre a fusão dos lisossomas com o fagossoma formando um complexo chamado fagolisossoma. O fagolisossoma ou vacúolo parasitóforo, apresenta um ambiente ácido, rico em peptídeos microbicidas e enzimas

hidrolíticas, além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que irão destruir o microorganismo invasor (Handman e Bullen, 2002; Stuart and Ezekowitz, 2005).

O presente trabalho comparou os parâmetros da imunidade inata de interiorização, capacidade microbicida e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio entre as duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, que possuem características de suscetibilidade e resistência à leishmaniose, respectivamente. Vários estudos têm demonstrado que as diferentes formas clínicas existentes na leishmaniose são devidas às características de virulência do parasito e da resposta imune estabelecida pelo hospedeiro (Gontijo e Carvalho, 2003).

Um dos aspectos analisados neste trabalho foi a capacidade de interiorização das leishmânias pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c e C57BL/6 expostos *in vitro* a *L. amazonensis*. O processo de interiorização da leishmânia pode ser um fenômeno determinado pela fagocitose do parasito pelo macrófago, mas, no caso das leishmânias, pode ocorrer também a interiorização do parasito por um processo ativo de infecção do macrófago pela leishmânia, por isto, neste trabalho, estamos nos referindo ao processo global como índice de infecção, pois não é possível diferenciar o que foi decorrente do macrófago do que foi determinado pela leishmânia.

A interiorização dos macrófagos é um passo fundamental, pois é quando se inicia os mecanismos de defesa antiparasitários ou de escape do parasita das defesas do hospedeiro. Tanto os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c quanto os macrófagos dos camundongos C57BL/6 após 24 h de infecção, aumentaram a proporção de células participando da interiorização de leishmânia em comparação aos seus próprios grupos no tempo de 6 h (figuras 2 e 3). Mas, não foi possível detectar diferença entre os dois modelos quanto ao índice de infecção dos macrófagos. Ou seja, a entrada da leishmânia pareceu similar nos diferentes macrófagos analisados, tanto os

macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis (BALB/c) quanto dos resistentes (C57BL/6) têm capacidade de interagir com a leishmânia permitindo sua entrada de forma semelhante. Isso sugere que não deve haver diferenças na expressão dos receptores de membrana dos macrófagos que propiciam a entrada deste patógeno e influenciando também a resposta imunológica, tendo em vista que para iniciar a doença as promastigotas precisam entrar eficientemente nos fagócitos mononucleares e evadir de fatores celulares e humorais (Wilson and Pearson, 1988).

A entrada da leishmânia no macrófago envolve o reconhecimento de ligantes específicos na superfície da leishmânia pelos receptores de membrana da superfície da célula hospedeira, ocorrendo então a interiorização do parasito (Guy and Belosevic, 1993). As características dessa interação como a especificidade, saturabilidade e inibição competitiva são levadas em consideração nesse estágio (Klempner et al, 1983). Alguns estudos identificaram receptores que estão envolvidos na entrada das promastigotas.

Foi demonstrado que o bloqueio do receptor para mannose-fucose (MRF) inibiu a ingestão de promastigotas de *L. donovani* por macrófagos murinos; nos macrófagos humanos, tanto a ingestão quanto o ancoramento das promastigotas foram inibidas (Gordon, 1985). Além do receptor para os produtos finais de glicação avançada (AGE) (Barbosa et al, 2008), receptores para fibronectina, receptor Fc (FcR) e receptores para complemento CR1 e CR3 (Guy and Belosevic, 1993) participam da interiorização do parasito.

Guy e Belosevic (1993) demonstraram que, quando opsonizadas com IgG específicas para *L. major*, tanto promastigotas quanto amastigotas dessa espécie entram mais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, sugerindo um importante papel dos receptores Fc para a infecção.

Apesar de relatarem quais receptores são usados para a entrada do parasito nos macrófagos, não há estudos que verifiquem diferenças na quantidade ou expressão desses receptores nos diferentes macrófagos. Esse estágio inicial é importante para o desenvolvimento da doença e precisa ser mais bem caracterizado.

No presente estudo foi avaliada a entrada de *L. amazonensis* pelos receptores de padrões moleculares de patógenos (PAMPs). Não foi encontrada diferença na capacidade de interiorização dos parasitos entre os macrófagos das linhagens suscetível (BALB/c) e resistente (C57BL/6).

Saldanha (2009) demonstrou que a atividade fagocitária de PBMCs de indivíduos com leishmaniose para leveduras estava diminuída quando comparado com indivíduos controles normais não infectados, sendo que, após o tratamento com antimoniato, os monócitos dos indivíduos infectados aumentaram a capacidade fagocitária. Demonstrou também que os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vivo* com *L. amazonensis* possuíam maior capacidade fagocitária para leveduras do que os macrófagos de camundongos não infectados, já para os macrófagos de camundongos resistentes não observou diferenças na capacidade para fagocitar leveduras entre os animais infectados ou não. Porém, pela comparação entre os dois modelos, os animais resistentes apresentaram maior capacidade fagocitária.

Neste trabalho, para verificar se as respostas dos dois modelos decorriam de diferenças nas capacidades microbidas dos fagócitos analisamos a sobrevivência das leishmânias após a interiorização (figura 6). Na cultura onde havia macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis (BALB/c) observou-se um aumento exponencial na quantidade de leishmânias a partir do 4º dia de acompanhamento. Já na cultura com macrófagos de camundongos resistentes, observou-se que o crescimento dos parasitos foi mais lento, sugerindo que a capacidade microbida dos macrófagos

dos animais resistentes é mais eficiente, pois não observamos diferença na capacidade de interiorizar o parasito e nem no número de macrófagos aderidos à lâmina após 24 h de incubação.

Nossos dados são semelhantes aos de Handman et al (1979), que avaliou a infecção em diferentes camundongos com genótipos de resistência parcial (CBA/H, C3H/He e A/J), suscetibilidade total (BALB/c e DBA/2) e resistente (NZB e C57BL/6) à infecção pela *L. tropica* e observou que nas primeiras horas da infecção, a interiorização do parasito não foi influenciada pelo genótipo dos camundongos, sendo que cerca de 30-40% das células estavam infectadas. Porém, após 7 dias de infecção houve uma diminuição na porcentagem de macrófagos infectados na linhagem C57BL/6 (resistente) enquanto que nos camundongos BALB/c a quantidade de macrófagos infectados ficou em torno de 60-70% no mesmo dia.

Beil et al (1992) demonstraram que na lesão de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6) infectados com *L. major*, no estágio inicial as células que estão presentes no infiltrado inflamatório dos camundongos BALB/c são principalmente neutrófilos, enquanto que nos C57BL/6 estão presentes macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. Após 2 dias de infecção, observaram que na lesão dos camundongos suscetíveis a porcentagem de células contendo leishmânias intactas era duas vezes maior nos camundongos suscetíveis do que na lesão dos animais resistentes. E nos dias 4 e 12 após a infecção, na lesão dos camundongos suscetíveis havia 200 parasitos/100 células e 130 parasitos/100 células, respectivamente, sendo que, os camundongos C57BL/6 apresentaram 160 parasitos/100 células e 80 parasitos/100 células no dia 4 e 12, respectivamente.

Não encontramos diferença entre os dois modelos de camundongos na interiorização das leishmânias. Como também não encontramos diferença entre os dois

modelos no número de macrófagos aderidos à lamínula de onde recuperamos as leishmânias. Entretanto, o número de leishmânias recuperadas dos macrófagos que cresceram em cultura foi significativamente maior para os camundongos suscetíveis à infecção. Isto sugere que deve haver diferença no maquinário microbicida dos dois modelos de animais.

Após o processo da fagocitose, fatores microbicidas intracelulares são ativados para a eliminação do microorganismo invasor, entre eles, o óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Com o objetivo de verificar se havia diferença na produção destas moléculas microbicidas, analisamos sua produção nos dois modelos de camundongos estudados.

São várias as evidências que implicam a produção de NO como parte de resposta efetiva contra infecção. Neste trabalho, comparando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados *in vitro* com *L. amazonensis*, observamos que nos macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis BALB/c a produção basal deste radical livre aumentou gradativamente nas primeiras 24 horas. Porém, o contato com a *L. amazonensis* determinou uma queda na concentração do NO. Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos da literatura que mostraram inibição desse radical pela *Leishmania sp.* Sarkar e et al (2011) demonstraram menor produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania donovani* do que os não infectados, bem como, houve menor produção do NO pelos monócitos de sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose visceral do que pelos PBMC de indivíduos saudáveis. Balestieri et al. (2002), utilizando macrófagos murinos cultivados *in vitro* (linhagem J774-G8), observou menor produção de NO na infecção pela *L. amazonensis* em relação às células controle.

Por outro lado, ao analisarmos a produção do NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos resistentes C57BL/6, não observamos essa modulação negativa pela leishmânia, não havendo diminuição significativa na concentração de NO nas 24h. Observamos que na presença da *Leishmania amazonensis*, os macrófagos dos camundongos BALB/c produziram mais NO na primeira hora de incubação do que os macrófagos dos camundongos C57BL/6, porém nos outros tempos avaliados (6h e 24h), a concentração de NO no sobrenadante das culturas dos macrófagos dos camundongos BALB/c decaiu, enquanto que no sobrenadante das culturas dos macrófagos dos camundongos C57BL/6 aumentou gradativamente. É possível que esta incapacidade para manter a produção da molécula leishmanicida NO na presença da leishmânia, contribua para as diferentes evoluções da doença observada nestes dois modelos.

Díaz et al (2003) infectaram camundongos BALB/c e C57BL/6 com *Leishmania mexicana* e detectaram a produção do NO por 12 dias após a infecção, como também analisaram a presença da iNOS nas lesões dos camundongos estudados. Esses autores mostraram que tanto os camundongos BALB/c quanto os C57BL/6 produziram óxido nítrico, porém, os macrófagos dos camundongos BALB/c apresentaram um pico na produção no 3º dia de infecção, decaindo nos dias seguintes para níveis basais, enquanto os camundongos C57BL/6 produziram óxido nítrico em quantidades relevantes desde a primeira semana de infecção, mantendo os níveis elevados até o 6º dia da infecção. Já *in situ*, os autores observaram a presença mais aumentada da enzima iNOS nas lesões dos camundongos C57BL/6 do que nos BALB/c, concluindo que a produção antecipada e mantida nas semanas iniciais da infecção são cruciais para impedir o crescimento do parasito.

Os dados deste trabalho também são semelhantes aos observados por Saldanha (2009), que, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis (BALB/c)

ou resistentes (C57BL/6) infectados ou não *in vivo* com *L. amazonensis*, verificou que a produção de NO pelos macrófagos de camundongos BALB/c infectados é menor do que daqueles não infectados, e mesmo o estímulo *in vitro* com LPS não foi capaz de alterar a produção desse radical. Nos camundongos C57BL/6 não houve alteração significativa na produção do NO pela infecção dos animais com a leishmânia (Saldanha, 2009).

Steffens et al (1994) demonstraram que a expressão da enzima iNOS e a produção de NO pelos camundongos C57BL/6 foi diferente em relação aos camundongos BALB/c quando desafiados com *L. major* e estimulados com IFN- γ . Outros trabalhos corroboram o fato de que os macrófagos dos camundongos BALB/c são menos responsivos a estímulos. Oswald et al (1992) estimularam macrófagos de camundongos BALB/c, C57BL/6 e (B6 x D2)F1 com dimicolato de trealose (TDM), um glicolípido micobacteriano, potente ativador de macrófagos, e observaram que os camundongos BALB/c não controlam o crescimento de BCG *in vitro* eficientemente como os macrófagos das outras linhagens. Santos et al (2006) afirmam que os macrófagos de camundongos C57BL/6 são mais sensíveis a estímulos por LPS para produção de NO do que os camundongos BALB/c e acrescentaram que a produção diferenciada estava correlacionada com o acúmulo de mRNA da proteína iNOS, que se mostrou regulada de forma diferente nessas duas linhagens. Os autores discutiram que o grande acúmulo da iNOS nos macrófagos dos animais C57BL/6 é independente de sua estabilidade, e assim, é possível que a transcrição do gene nestas células sejam mais eficientes do que nos camundongos BALB/c. Adicionalmente, como os níveis de proteínas iNOS são mais elevados nos macrófagos dos animais C57BL/6, sugerem que as diferenças entre as linhagens seja pós-traducional ou translacional.

A diferença na produção de óxido nítrico entre os dois modelos de camundongos demonstrada em nossos estudos podem estar relacionadas com a atividade da arginase,

uma enzima que compete com a iNOS convertendo L-arginina em L-ornitina, importante para a resposta anti-inflamatória e estimulada pelo padrão de citocinas LTA-1 (Wanasen and Soong, 2008). Iniesta et al (2005) demonstraram que ao comparar a atividade dessa enzima em camundongos suscetíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL/6) no início da infecção a atividade é semelhante nos dois modelos, entretanto, ao longo do tempo, nos macrófagos dos camundongos BALB/c a atividade da arginase permanece enquanto que nos macrófagos do camundongos C57BL/6 a atividade decai progressivamente ao mesmo tempo que a atividade da iNOS aumenta.

Como foi observado um menor crescimento de leishmânias recuperadas dos macrófagos dos camundongos C57BL/6, sugerimos que fatores microbicidas possam estar relacionados com esse dado. Além do NO, analisamos a produção do peróxido de hidrogênio, que também age como agente microbicida, para verificar seu papel nesta resposta dos macrófagos para as leishmânias. Observamos um aumento na produção do H₂O₂ pelos macrófagos dos camundongos suscetíveis BALB/c na presença de *L. amazonensis*, 6h após o início da infecção, em relação aos macrófagos que não foram infectados com o parasito. Surpreendentemente, não houve diferença estatística na produção do peróxido entre os macrófagos dos camundongos C57BL/6 infectados ou não infectados, nas primeiras 24 horas de incubação. Entretanto, a produção basal do H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais na ausência de leishmânia dos animais resistentes (C57BL/6) foi mais elevada desde a primeira hora de incubação, em relação ao observado para os macrófagos dos camundongos suscetíveis (BALB/c). Quando adicionamos as leishmânias em cultura encontramos o mesmo padrão de resposta, os níveis de peróxido de hidrogênio no sobrenadante dos macrófagos peritoneais dos camundongos resistentes foram mais elevados do que o dos camundongos suscetíveis.

Na leishmaniose, o papel do peróxido de hidrogênio ainda não está esclarecido. As *Leishmania sp.* são suscetíveis a ação do peróxido de hidrogênio, como demonstrado por Wilson et al (1994), que incubaram promastigotas de *L. donovani chagasi*, na fase estacionária, em meio de cultura com concentrações crescentes (0 a 1200 μ M) de peróxido de hidrogênio, por 60 min. Mostraram que a motilidade e a capacidade de sintetizar proteínas diminuíram de modo dose-dependente da concentração do peróxido de hidrogênio.

Murray, em 1981, avaliando a suscetibilidade de *L. tropica* e *L. donovani* ao peróxido de hidrogênio, observou imobilização ou lise das promastigotas em contato com H₂O₂. Como também verificou que as promastigotas dessas espécies são capazes de estimular os macrófagos a produzirem H₂O₂. Observou também que os macrófagos residentes tanto de linhagens suscetíveis quanto resistentes produziram peróxido de hidrogênio de forma similar quando desafiadas com as promastigotas dessas espécies, e o processo foi dependente do tempo de exposição e da quantidade do inóculo.

Tem sido demonstrado que macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c são capazes de matar amastigotas da espécie *L. guyanensis*, mas não da *L. amazonensis*, e os mecanismos pelo qual os parasitos são eliminados são dependentes de espécies reativas de oxigênio e que o peróxido de hidrogênio pode ser o agente responsável por essa atividade, sugerindo que os radicais de oxigênio, podem contribuir para o controle da doença (Sousa-franco et al, 2005).

Utilizando camundongos com doença granulomatosa crônica ligada ao X, com deficiência na enzima gp91^{phox}^{-/-}, que apresentam deficiência na produção de radicais de oxigênio, e camundongos *knockout* para enzima iNOS, Murray and Nathan (1999) observaram que camundongos deficientes na enzima iNOS não conseguiram controlar a infecção, entretanto os camundongos com doença granulomatosa conseguiram conter a

infecção. Mas após a segunda semana de infecção, nenhum dos camundongos obteve sucesso no recrutamento de células inflamatórias para o tecido infectado, sugerindo que tanto as espécies reativas de oxigênio quanto o NO trabalham em sinergia para a eliminação do patógeno nos estágios iniciais da doença, porém, que o papel do NO no decorrer da infecção é mais importante e suficiente para eliminação do patógeno (Murray and Nathan, 1999).

Nossos dados estão de acordo com as observações de Oswald et al. (1992), que mostraram que os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c são menos responsivos frente a ativadores de macrófagos do que os camundongos C57BL/6. A produção do peróxido de oxigênio pelos macrófagos de camundongos BALB/c foi 50% menor do que a produção pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6.

Domínguez et al (2010) demonstraram que tanto os macrófagos dos camundongos BALB/c quanto C57BL/6 produziram quantidades similares de PKC α , enzima que participa da geração da explosão oxidativa, quando estimulados por LPG ou *L. mexicana*. Porém, quando avaliaram a atividade dessa enzima, observaram que nos macrófagos dos camundongos suscetíveis (BALB/c) houve uma inibição da atividade da PKC α , enquanto que nos macrófagos dos camundongos resistentes houve um aumento da atividade, junto com o aumento da explosão oxidativa. Para correlacionar a atividade da enzima e a explosão oxidativa com a morte do parasito, trataram macrófagos peritoneais das duas linhagens com PMA e observaram que os macrófagos dos camundongos C57BL/6 eliminaram 66% dos parasitos, enquanto que nos macrófagos dos camundongos BALB/c, 92% das leishmânias sobreviveram às espécies reativas de oxigênio.

Saldanha (2009), estudando pacientes com leishmaniose mostrou que a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos estava aumentada em relação aos indivíduos

normais. Saldanha (2009) avaliou também a produção de peróxido de hidrogênio por camundongos BALB/c (suscetível) e C57BL/6 (resistente) infectados ou não com *L. amazonensis*. Os macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis infectados com *L. amazonensis* produziram mais peróxido de hidrogênio do que os macrófagos dos animais não infectados. Enquanto que, no modelo resistente (C57BL/6), não houve diferença na produção do H₂O₂ entre os grupos infectados ou não.

Entre as limitações de nosso trabalho podemos referir que há uma grande variabilidade genética em seres humanos, diferentemente dos modelos por nós estudados que apresentam limitação na variação genética. Outra limitação importante é que a interação entre o parasito e o macrófago foi em condições de cultura, diferente da forma natural da transmissão para os seres humanos, que ocorre na presença de outras células e de substâncias da saliva do flebotomíneo que podem interferir na resposta do hospedeiro e na quantidade de parasitos inoculados, que deve ser muito menor na inoculação natural do que a utilizada em cultura (Rogers et al, 2004).

Apesar dessas limitações, podemos, entretanto, sugerir que esses dados contribuíram para esclarecer que a interação da *Leishmania amazonensis* com os macrófagos modulou negativamente a produção de óxido nítrico em camundongos suscetíveis, mas não nos camundongos resistentes. Os macrófagos dos camundongos C57BL/6, resistentes à leishmânia, foram capazes de eliminar o parasito mais eficientemente do que os macrófagos da linhagem suscetível BALB/c. A produção precoce mais elevada de H₂O₂ e a capacidade de manter a resposta de NO por tempo mais prolongado parecem ter sido fatores importantes para a resposta de suscetibilidade ou resistência a *Leishmania amazonensis*. Nossos dados, portanto, contribuíram para esclarecer alguns mecanismos iniciais envolvidos nas respostas de suscetibilidade ou resistência à infecção pela *Leishmania amazonensis*.

CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que a linhagem suscetível BALB/c e a resistente C57BL/6 apresentam capacidades semelhantes para interiorizar *Leishmania amazonensis in vitro*.

A sobrevivência das leishmânias recuperadas dos macrófagos dos animais resistentes (C57BL/6) após a interiorização foi significativamente menor do que a dos parasitos recuperados dos macrófagos dos animais suscetíveis (BALB/c).

A suscetibilidade e a resistência das linhagens estudadas parecem estar relacionadas com a produção diferenciada das moléculas microbidas NO e H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c e C57BL/6.

- 1- Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (suscetíveis) produzem óxido nítrico mais precocemente que os macrófagos dos camundongos C57BL/6 (resistentes), porém, quando infectados com a *L. amazonensis*, há uma modulação negativa na produção do NO pelos macrófagos dos camundongos BALB/c, que não ocorre para os macrófagos dos camundongos C57BL/6, que mantêm a produção mais elevada até 24 h.
- 2- A produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 foi maior do que o dos camundongos BALB/c mesmo quando infectados com *L. amazonensis*.

BIBLIOGRAFIA

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783–801.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 2012; 7: 1-12.

Alvarez-Rueda N. Infectivity of *Leishmania mexicana* is associated with differential expression of protein kinase c-like triggered during a cell-cell contact. *Plos One*, 2009; 4: e7581.

Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*, 1994; 24: 672–676.

Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infection and Immunity*, 1994; 62:2590-2599

Awasthi A, Mathur R K, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, 2004; 119:238-258.

Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn Ide A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes and Infection*, 2002; 4:23–29.

Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia*, 2008; 52:940-950.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 2006; 29: 113-123,

Barreto RL, Correia CRD and Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*, 2005; 28: 1046-1054.

Beckman JS and Koppenol W H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 1996; 271: C1424-C1437.

Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Difference in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 1992; 52: 135-142.

Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S. Chemokine-Induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric Oxide. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002;185:1704–8

Blackwell JMR, Ezekowitz MB, Roberts JY, Channon RB and Gordon S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *Journal of Experimental Medicine*, 1985; 162:324-331.

Channon JY, Roberts MB and Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, 1984; 53:345-355.

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

Da Silva MFL. A relação entre a localização celular da arginase na *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel durante a infecção em macrófago. Tese (doutorado em fisiologia geral). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Das M, Mukherjee SB and Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Cell Science*, 2001; 114: 2461-2469.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and immunity*, 1998; 66: 827-829

Díaz NL, Fernández M, Figueira E, Ramírez R, Monsalve IB and Tapia FJ. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental dermatology*, 2003; 28:288-293.

Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Röllinghoff M, Gresser I, Bogdan C. Type 1 interferon (IFN α /b) and Type 2 nitric Oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*, 1998; 8: 77–87.

Domínguez JD, González-Aguilar H, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L, Berzunza-Cruz M, Ruiz-Remigio A, Robles-Flores M, Becker I. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunology*, 2010; 32:440-449.

Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes and Infection*, 2003; 5: 507–513.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2003; 39:343-350.

Fang FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal Clinical Investigation*, 1997; 99: 2818–2825.

Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos, Von Zuben HFJ, Yamada A and Augusto O. *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 1998; 66: 807–814.

Gontijo B and Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003; 36:71-80.

Goto H and Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2010; 8: 419-433

Goto H. Imunidade inata e imunopatogenia nas leishmanioses experimentais. Tese de livre docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR. Nitrate biosynthesis in man. Proceedings of National Academy of Science, 1981; 78: 7764 - 7768.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine- dependent killing mechanism. The Journal of Immunology 1990; 144: 278-283.

Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. Immunology letters, 1990; 25:15-20.

Guy RA and Belosevic M. Comparison of Receptors Required for Entry of *Leishmania major* Amastigotes into Macrophages. Infection and Immunity, 1993; 61: 1553-1558

Handman E and Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 2002; 18: 332-334.

Handman E, Ceredig R and Mitchell GF. Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *The Australian Journal of Experimental and Biology and Medical Science*, 1979; 57: 9-29.

Handman, E, Elso C, Foote S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 2005; 59: 1–75.

Herwaldt B.L. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-9.

Honoré S, Garin YJ, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *Immunology and Medical Microbiology*, 1998; 21: 231-239.

Huber M, Timms E, Mak TW, Röllinghoff M, Lohoff M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infection and Immunity*, 1998, 66: 3968–3970

Iniesta V, Carcelén J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infection and Immunity*, 2005; 73:6085-6090.

James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Review*, 1995; 59: 533-47.

Khourri R, Novais F, Santana G, de Oliveira CI, Vannier dos Santos MA, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. DETC induces *Leishmania* parasites killing in human in vitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *Plos One*, 2010; 5: e14394.

Klempner MS, Cendron M, Wyler DJ. Attachment of plasma membrane vesicles on human macrophages to *Leishmania tropica* promastigotes. *Journal of Infection Diseases*, 1983; 148:337-384.

Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGFB treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *The Journal of Immunology*, 1999; 162:974-979.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ and Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology*, 1990; 144: 4794–4797.

Lipoldová M and Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature*, 2006; 7:294-305.

Locksley RM, Reiner SL, Hatam F, Littman DR, Killeen N. Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science*, 1993; 261: 1448-51

Macedo-Silva ST, de Oliveira Silva TL, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Molecular Biology International*, 2011; 2011:1-12.

Matsubara LS and Ferreira ALA. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 1997; 43: 61-8

Mauël J, Ransijn A and Buchmüller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-Arginine – dependent process that produces nitrogen derivatives. *Journal of Leukocyte Biology*, 1991; 49:73-82.

Maurer, M., Dondji, B. and von Stebut, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, 2009; 198:137–146.

McElrath MJ, Kaplan G, Nusrat A and Cohn Z. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell Influx in BALB/c mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 1987; 165: 546-559.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2. *The Journal of Immunology*, 2000; 164:6166-6173.

Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Seminars in Immunology*, 2004; 16:107-17.

Muniz-Junqueira MI, Prata A, Tosta CE. Phagocytic and bactericidal function of mouse macrophages to *Salmonella typhimurium* in schistosomiasis mansoni. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992; 46:132-136.

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

Murray HW and Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. The Journal of. Experimental Medicine, 1999; 189: 741–746.

Murray HW. Suscetibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. The Journal Experimental Medicine, 1981; 153: 1302-1315

Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. PLoS Pathogens, 2008; e1000222: 4-11.

Nylén S and Akuffo H. Tracing immunity to human leishmaniasis. Future Microbiology, 2009; 4(2): 241–254

Oswald IP, Afroun S, Bray D, Petit JF and Lemaire G. Low response of BALB/c macrophages to priming and activating signals. *Journal of Leukocyte Biology*, 1992; 52:315-322.

Paula MR. Influência do tratamento de camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA com pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoneais in vitro. Tese. Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 2008; 321:970–974.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic immunoassay reader. *Journal Immunological Methods*, 1981; 46: 211-226.

Pinto EF, Cortezia MM and Rossi-Bergmann B. Interferon gamma inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 2003; 21: 3534-3541

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 2004; 430: 463–467

Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 1995; 9:200-209.

Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. Trends in Parasitology, 2009; 25: 383-391.

Saldanha, RR. Influência do tratamento com N-metil-glucamina sobre a fagocitose, a produção de radicais de oxigênio e de nitrogênio e a produção de FNT α , IFN- γ e IL-10 por fagócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentars americana e de camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*. Tese. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

Santos JL, Andrade AA, Dias AA, Bonjardim CA, Reis LF, Teixeira SM, Horta MF. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN- γ /LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2006; 26: 682-688.

Sarkar A, Saha P, Mandal G, Mukhopadhyay D, Roy S, Singh SK, Das S, Goswami RP, Saha B, Kumar D, Das P, Chatterjee M. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: its applicability in patients with visceral leishmaniasis. Cytometry Part A, 2011; 79A: 3545.

Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chemistry and Biology*, 1995; 2: 13-22

Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Boletim epidemiológico de leishmaniose visceral – 2009, ano base 2008.

SES/DF. Informativo epidemiológico das leishmanioses (leishmaniose visceral e Tegumentar) no DF. SVS/DVG/SES/DF, 2012; 3:1-6.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 2009; 31: 423–31.

Sousa-Franco J, Araújo-Mendes E, Silva-Jardim I, L-Santos J, Faria DR, Dutra WO, Horta MF. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes and Infection*, 2006; 8: 390-400.

Steffen S, Thüring H, Röllinghoff and Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1994; 180:783-793.

Stuart LM and Ezekowitz RAB. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 2005; 22:539–550.

SVS/MS. Boletim eletrônico epidemiológico; situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Ministério da saúde do Brasil, 2010; 2: 2-24.

Turvey SE and Broide DH. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010; 125:S24-32.

Umakanti S and Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology* 2009; 47: 412-423.

Underhill DM. Phagosome maturation: steady as she goes. *Immunity*, 2005; 23: 343–346.

Van Assche T, Deschacht M, Luz RAI, Maes L, Cos P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011; 51: 337–351.

Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000; 192: 227-236.

Wanasen N and Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunologic Research*, 2008; 41:15-25.

Wei X Q, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 1995; 375: 408–411.

Wilson ME and Pearson RD. Roles of CR3 and Mannose Receptors in the Attachment and Ingestion of *Leishmania donovani* by Human Mononuclear Phagocytes. *Infection and Immunity*, 1988; 56:363-369.

Wilson ME, Andersen KA, Britigan BE. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infection and Immunity*, 1994; 62:5133–5141.

WHO. World Health Organization. *Leishmaniasis*. http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html. Acesso em 28 de julho de 2012.

WHO (World Health Organization). Cutaneous Leishmaniasis: Why are neglecting me? Informal consultive meeting for the control of cutaneous leishmaniasis in the middle east and Maghreb. 2007.

Zarley JH, Britigan BE, Wilson ME. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes. *The Journal of Clinical Investigation*, 1991; 88: 1511-1521.

ANEXO 1



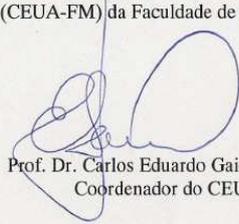
Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Brasília, 27 de fevereiro de 2012

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Produção de mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis e resistentes a infecção por *Leishmania amazonensis*”, UnBDoc 10920/2012, sob responsabilidade da Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM